

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GLOBAL Y
METILACIÓN DEL GENOMA EN PACIENTES MASCULINOS CON
ALOPECIA ANDROGENÉTICA”**

POR

M.C. LIZETH ALEJANDRA MARTÍNEZ JACOBO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA**

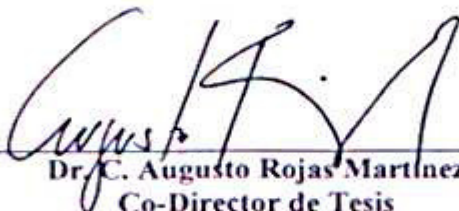
OCTUBRE, 2017

**“ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GLOBAL Y METILACIÓN DEL
GENOMA EN PACIENTES MASCULINOS CON ALOPECIA
ANDROGENÉTICA”**

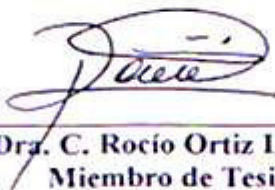
Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Directora de Tesis



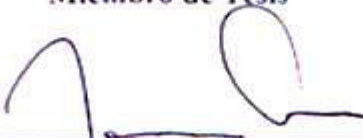
Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Co-Director de Tesis



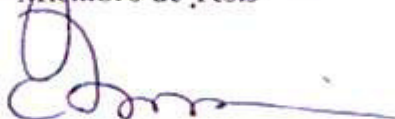
Dra. C. Rocío Ortiz López
Miembro de Tesis



Dr. med. Carlos Eduardo Medina De la Garza
Miembro de Tesis



Dr. med. Jesús Ancer Rodríguez
Miembro de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Estructural del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, así como en la Unidad de Genómica del Centro de investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret, la co-dirección del Dr. C. Augusto Rojas Martínez y como miembro de la comisión la Dra. C. Rocío Ortiz López, el Dr. med. Carlos Eduardo Medina De la Garza y el Dr. med. Jesús Ancer Rodríguez.

Vo.Bo.

Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret
Directora de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar el posgrado.

A mis Padres y Hermanas, por su apoyo incondicional y confianza para cumplir mis metas a pesar de las dificultades.

A la Dra. Celia Sánchez y la Dra. Carmen Villalobos por fomentar en mí el gusto por la biología molecular desde el pregrado y enseñarme a trabajar en el laboratorio, pero principalmente por su gran apoyo y la confianza que pusieron en mí.

A la Dra. Rocío Ortiz López y al Dr. Augusto Rojas, por todo su apoyo para la realización de este proyecto y por permitirme formar parte de la UG.

A Geo Clavo por su gran amistad y sus enseñanzas en las técnicas moleculares.

A la Dra. Viviana Zomosa por su valioso apoyo en este trabajo de tesis.

A mis compañeros de la UG: Geo, Sandra, Laura, Adriana, Yadira, Ernesto, José Ramón, Montufar, Biankita, Grecia, Ana V y la Química Paty, por su apoyo y por hacerme sentir parte del equipo.

A Carmelita Ibarra y Sayde Mireles por su apoyo en los momentos críticos para iniciar esta etapa de mi formación profesional y por su gran amistad, jamás olvidaré lo que han hecho por mí.

A Olga Hernández y Carlos Salas, por motivarme a seguir preparándome y por su apoyo para el proceso de titulación.

DEDICATORIA

A mi esposo: Por apoyarme en todo momento para lograr esta meta profesional, por comprender mis ausencias y motivarme a seguir mejorando, pero sobre todo por su amor.

A mi hijo: porque llegaste para alegrar nuestras vidas y me has dado motivo para ser mejor persona y profesionista cada día.

A Olga Hernández: “Porque, aunque ya no estas físicamente con nosotros vives en nuestros corazones”.

A todos ustedes, con Amor

Liz

“Después de escalar una montaña muy alta, descubrí que hay muchas otras montañas por escalar” ...Nelson Mandela

CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
1. Introducción.....	1
1.1 Funciones del pelo	2
1.1.2 Ciclo de crecimiento del pelo.....	3
1.2 Embriología.....	3
1.3 Morfogénesis del folículo piloso	4
1.4 Anatomía del folículo piloso	5
1.5 Alopecia Androgenética	7
1.5.1 Clasificación clínica.....	8
1.5.2 Etiología	9
1.5.3 Fisiopatología.....	11
1.5.4 Efecto de los Andrógenos.....	11
1.5.5 Histología	12
1.5.6 Tratamiento	12
1.7 Genética y AAG	13
1.7.1 Asociación del cromosoma X con AAG	14
1.7.2 Loci de riesgo para AAG en Autosomas	15
1.8 Antecedentes	17
1.7.4 Metilación del ADN.....	19
1.7.4.1 Metilación del ADN en mamíferos.....	21
1.7.4.2 Impronta Genómica	24
1.7.4.3 Metilación del ADN en las células normales y estados de enfermedad	24
1.7.4.4 Metilación del ADN y Alopecia Androgenética	25
CAPÍTULO II.....	28
2.1 JUSIFICACIÓN	28
CAPÍTULO III.....	29
OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GENERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO IV	29

DISEÑO METODOLÓGICO	29
4.1 Diseño del estudio	29
4.2 Universo de estudio	29
4.3 Muestra de estudio	29
4.4 Criterio de inclusión	29
4.5 Criterio de exclusión	29
4.6 Criterio de eliminación	31
4.7 Criterios de inclusión del grupo control.....	31
CAPÍTULO V	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1 Estrategia General.....	32
5.2 MATERIALES	33
5.2.1 Consumibles.....	33
5.2.2 Reactivos	33
5.2.3 Material Biológico	35
5.2.4 Equipo	35
5.2.4 Programas computacionales.....	36
5.3 MÉTODOS (ver anexos).....	37
5.3.1 Lugar donde se realizó el estudio.....	37
5.3.2 Análisis del ARN para microarreglos de expresión	38
5.3.2.1 Naturaleza de la muestra	38
5.3.2.2 Extracción de ARN.....	38
5.3.3 Microarreglos de Expresión	39
5.3.4 Control de calidad del escaneo en plataforma Affymetrix	45
5.3.5 Identificación de genes diferencialmente expresados.....	45
5.3.6 Identificación de las vías de señalización en las que participan los GDE.....	46
5.3.7 Análisis de metilación por secuenciación Masiva	46
5.3.7.1 Extracción de ADN.....	46
5.3.7.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN.....	48
5.3.7.3 Preparación de librerías para secuenciación	49
5.4 Validación de los resultados de expresión por Q-PCR	49
CAPÍTULO VI	53

RESULTADOS.....	53
6.1 Análisis demográfico	53
6.2 Evaluación de Calidad del RNA	57
.....	58
6.1.2 Control de Calidad de microarreglos	58
6.1.3 Expresión diferencial por microarreglos	58
6.1.4 Análisis de Procesos biológicos y vías de señalización en AAG.....	63
6.1.5 Análisis de interacción con STRING v10.0	66
6.1.5 Análisis de genes asociados con AGA en estudios previos.....	67
6.2 Evaluación de kits de extracción de DNA	66
6.2.1 Control de calidad del Análisis de metilación global mediante secuenciación masiva.....	68
6.2.2 Análisis de metilación global mediante secuenciación masiva.	69
6.2.3 Identificación de sitios de metilación diferencial.....	75
6.2.4 Análisis estadístico de metilación diferencial.....	71
6.2.5 Análisis de Interacción funcional.....	74
6.2.6 Vías de señalización asociadas a los GDM.	74
6.3.1 Correlación entre los perfiles de expresión y metilación global y selección de genes candidatos.	76
6.3 Análisis de expresión de los genes propuestos por PCR tiempo real.....	77
CAPÍTULO VII.....	79
DISCUSIÓN.....	79
7.1 Análisis de expresión génica en pacientes con AAG.....	79
7.2 Análisis de metilación por secuenciación masiva en pacientes con AAG.....	85
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXOS.....	93

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de crecimiento del pelo.	3
Figura 2. Folículo Piloso. Tomado del libro Anatomía de Grey.	6
Figura 3. Clasificación clínica de AAG según la escala de Hamilton-Norwood.	9
Figura 4. Gráfico de componentes principales de las muestras de AAG y controles del estudio de Chew et al.2017.	18
Figura 5. Genes diferencialmente expresados en la región de vértex y occipital de los pacientes con AGA.	19
Figura 6. Metilación del ADN.	22
Figura 7. Procedimiento general para análisis de expresión con microarreglos Affymetrix.	45
Figura 8. Metodología general para análisis de metilación por secuenciación masiva.	48
Figura 9. Metodología general para el análisis de expresión de los genes HSD17B6 y WNT3 en PCR Tiempo Real.	49
Figura 10. Clasificación clínica de los pacientes con AAG.	51
Figura 11. Antecedentes familiares de AAG.	55
Figura 12. Árbol genealógico de 3 hermanos con AAG.	56
Figura 13. Correlación entre el grado de afección y la edad. Análisis de correlación de Pearson (GraphPad 7).	56
Figura 14. Electroforesis capilar de RNA total de biopsias de cuero cabelludo.	57
Figura 15. Distribución de datos después de aplicar el método RMA"Quantile Normlization".	59
Figura 16. Histograma de la señal de los datos del RMA de microarreglos de expresión.	57
Figura 17. Mapa de calor de la correlación de Pearson y Spearman de los microarreglos de expresión.	58
Figura 18. Mapa de calor del perfil de expresión de la región de calvicie vs la región occipital.	59
Figura 19. Análisis en PANTHER para identificar el tipo de proteína que codifican los GDE. ¡Error! Marcador no definido.	62
Figura 20. Análisis en PANTHER v12.0 para identificar las vías de señalización en las que participan los GDE.	66
Figura 21. Mapa de interacción proteica de los GDE en región de calvicie vs sin calvicie.	66
Figura 22. Control de calidad con TRIM GALORE.	68
Figura 23. Flujo de trabajo para el análisis de metilación con Bismark v.0.17.0. DMRs(Differentially methylated regions).	69
Figura 24. Análisis de correlación de Pearson de las muestras para el análisis de metilación por secuenciación masiva.	70
Figura 25. Análisis de metilación diferencial por genes e islas CpG.	76
Figura 26. Análisis de metilación diferencial por potenciadores y cromosomas.	76
Figura 27. Genes diferencialmente metilados por secuenciación masiva. GraphPad 7.	78
Figura 28. Mapa de interacción proteica de los GDM (genes diferencialmente metilados).	74
Figura 29. Análisis en PANTHER de los tipos de proteínas que codifican los GDM.	75
Figura 30. Análisis en PANTHER de las vías de señalización en las que participan los GDM.	75

Figura 31. Mapa de interacción de los GDE y GDM.	76
Figura 32. Expresión de WNT3 por PCR Tiempo Real.	78
Figura 33. Expresión de HSD17B6 por PCR Tiempo Real.	78
Figura 34. Locus 17q21.31 asociado con AAG.	79

Índice de Tablas

Tabla 1. Loci autosómicos asociados con AAG.....	16
Tabla 2. Diferentes técnicas empleadas para investigar AAG.	27
Tabla 3. Clasificación clínica, edad actual y edad de inicio de los pacientes.	54
Tabla 4. Valores de Calidad de Integridad de RNA(RQI).	58
Tabla 5. Genes asociados con AAG en diferentes estudios.	68
Tabla 6. Lista de genes diferencialmente expresados entre la región de calvicie y la región occipital de los pacientes con AAG.	69
Tabla 7. Comparación de rendimiento de extracción de ADN.	66
Tabla 8. Sitios de metilación diferencial de los GDM.	79
Tabla 9. Genes diferencialmente metilados y valores de expresión (P value).	77

RESUMEN

M.C. Lizeth Alejandra Martínez Jacobo.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Área de estudio: Biología Molecular.

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas: 126

Título del estudio: “Análisis del Perfil de Expresión Global y Metilación del Genoma en Pacientes Masculinos con Alopecia Androgenética “

Introducción: La AAG o calvicie de patrón masculino es la forma más común de pérdida de cabello en humanos afectando principalmente a hombres caucásicos a la edad de 70 años. El uso de herramientas genómicas como los microarreglos ha permitido el tamizaje de individuos con AAG, así como la identificación de loci asociados con esta entidad dermatológica. Debido a los hallazgos de Hamilton en 1942 y su teoría androgénica los principales genes candidatos estudiados para AAG han sido las enzimas 5- α -reductasa tipo 1 y 2 (SRD5A1/2) y el gen del receptor de andrógenos (AR). Por consecuencia, los ensayos de expresión en muestras de pacientes con AAG han sido gen-específicas y no se ha correlacionado adecuadamente la clínica con la expresión de dichos genes y los niveles de DHT en sangre. Los estudios de expresión global en AAG son escasos. Recientemente se identificó que la *PTGDS* se encuentra sobre-expresada en la región de calvicie, sugiriendo la inhibición del crecimiento del cabello. También se identificó que la vía de señalización Notch era afectada en los pacientes con AAG. Michel et al., 2017 publicaron un estudio de análisis de expresión en hombres con AAG, el cual reveló que los genes que codifican las enzimas de los gránulos de los mastocitos, los mediadores inmunes inflamatorios y asociados con inmunoglobulinas estaban significativamente sobre-expresados en AAG, mientras que los genes sub-expresados eran asociados con las vías de señalización Wnt / β -catenina y BMP / TGF- β . Por otra parte, son relativamente pocos los estudios realizados a la fecha para comprender el papel de la epigenética en el folículo piloso, así como su participación en el desarrollo de AAG. A la fecha se conoce solo un estudio de análisis de metilación en pacientes con AAG, el cual se enfocó en la búsqueda de patrones de metilación de genes específicos como el gen del receptor de andrógenos (AR). No hay estudios de metilación global en AAG, por lo tanto es de suma importancia realizar una correlación entre ensayos de expresión y metilación en AAG para poder dilucidar los mecanismos moleculares de la misma.

Objetivo: Realizar un análisis de expresión y metilación global en pacientes con AAG para identificar genes involucrados en la patofisiología de esta entidad dermatológica.

Estrategia experimental: 1) Reclutamiento de pacientes con AAG y controles y firma de consentimiento informado. 2) Toma de biopsia de cuero cabelludo de la región afectada y la región occipital. 3) Extracción de ácidos nucleicos, cuantificación y verificación de calidad. 4) Análisis de expresión global con microarreglos de Affymetrix (Human GenomeU133 Plus 2.0 array expression), comparación de perfiles de expresión entre región

afectada y occipital de pacientes y controles y seleccionar genes candidatos. 5) Análisis de metilación por secuenciación masiva en HiSeq 2500 con el kit de preparación de librería Sure Select XT Methyl kit de Agilent e identificación de genes diferencialmente metilados en las regiones afectadas y occipitales de pacientes y controles. 6) correlación de los genes diferencialmente expresados y metilados de los pacientes con AAG y proponer genes candidatos asociados a la patofisiología. 7) confirmar por PCR Tiempo real la expresión de los genes candidatos.

Resultados: se recolectaron muestras y datos epidemiológicos de 16 pacientes con AAG y 2 controles. El análisis de expresión global permitió identificar 34 genes diferencialmente expresados ($P < 0.001$). Se identificaron 21 genes sobre-expresados y 13 genes sub-expresados. Entre los genes sobre-expresados en la región de calvicie se encuentran genes pertenecientes a familias con importantes funciones y anteriormente asociados con alopecia androgenética como *WNT3* y *BMP8*. *HSD17B6* un miembro de la familia de la retinol deshidrogenasa es un gen clave en el metabolismo androgénico, se encontró sobre-expresado, lo cual es de interés, debido a que AAG se ha asociado con niveles elevados de DHT en sangre y cuero cabelludo.

En cuanto al análisis de metilación se identificaron 18 regiones diferencialmente metiladas (DMRs) entre la región afectada y la región occipital de pacientes masculinos con alopecia androgenética y dos sujetos control. El punto de corte para este análisis fue de un 20% de metilación diferencial y un valor de $p < 0.05$. Las regiones diferencialmente metiladas se encuentran en el cuerpo génico de 14 genes. Se identificaron 13 DMRs en exones y 5 en intrones. Entre los genes con DMRs se encuentra *NINL*, *P2RY1*, *HTRA1*, *ENPP2*, *CCDC140*, *NKX6-1*, *PRMD6*, *PHLDA3*, *CCDC37*, *OPRM1*, *HOXA2* y *SFRP4*.

Finalmente, no se encontraron correlaciones entre genes diferencialmente expresados y genes diferencialmente metilados. Esto puede explicarse por la ausencia de DMRs en regiones reguladoras.

Conclusión: el cuero cabelludo de la región afectada de pacientes con AAG presenta una sobreexpresión de genes como *HSD17B6* que aumenta la conversión de α -dioles a DHT lo cual favorece la caída del cabello. Además de sobre- expresar *MLANA* y *TYR* que parecen ser indicadores de estrés oxidativo. La sobre-expresión de *WNT3* en la región de calvicie de los pacientes con AAG confirma la asociación del locus 17q21.31 con esta entidad dermatológica. La expresión de los principales genes asociados con AAG (*AR*, *WNT10A*, *SRD5A1/2*) resultó similar en las regiones afectadas por alopecia y la región occipital de pacientes y controles. Se confirma la participación de *PTGDS* en la patofisiología de AAG, debido a la sobre-expresión en la región de calvicie de los pacientes. Por otra parte, el presente trabajo muestra el primer ensayo de metilación global por secuenciación masiva en pacientes masculinos con AAG en el cual no se encontraron regiones promotoras o reguladores en las regiones diferencialmente metiladas entre las regiones afectadas y occipitales de los pacientes y no se observó correlación entre los genes diferencialmente expresados y los diferencialmente metilados en los pacientes con AAG.

Dra. C. Viviana Chantal Zomosa Signoret

Director de Tesis

CAPÍTULO I

1. Introducción

1.1 Funciones del pelo

El pelo es el apéndice más grande del cuerpo humano, posee vital importancia para el correcto funcionamiento del organismo. El pelo es exclusivo de los mamíferos y en algunos se presenta como cerdas, lanugo o el pelo terminal del hombre, en otros se manifiesta como pelos afilados como los del erizo o el puercoespín. Se distribuye en todo el tegumento exceptuando las palmas, plantas y labios (Suro-Reyes et al., 2007). La gran cantidad de terminaciones nerviosas que posee el pelo nos confieren la sensibilidad a la presión y al tacto, las cuales son muy importantes para el contacto y la comunicación corporal. En algunos animales el pelo tiene hasta dos mil terminaciones nerviosas lo que lo convierte en un ser más capaz de percibir a grandes distancias. El pelo es conductor de la secreción de las glándulas sebáceas y apócrinas, estas últimas se distribuyen especialmente en axilas e ingles y despiden un aroma característico para atraer a la persona del sexo opuesto (Suro-Reyes et al., 2007).

El pelaje en la mayoría de los mamíferos cumple diferentes funciones como termorregulación para mantenerlos calientes y secos, protección contra elementos dañinos del medioambiente, así como recolección de información sensorial, comunicación social y mimetismo (Alonso L & Fuchs E., 2006; Botchkarev VA & Paus R., 2003). En los seres humanos a pesar de que la principal función es de protección, el efecto estético es muy importante, pues la pérdida de cabello aun siendo una condición médica benigna genera un gran estrés psico-emocional en los individuos afectados, a menudo llevando a una reducción de la calidad de vida y a morbilidad secundaria (Hadshiew IM, Foitzik K, Arck PC & Paus R., 2004).

1.1.2 Ciclo de crecimiento del pelo.

El pelo se produce en los folículos pilosos a través de un ciclo de proliferación y regresión conocido como ciclo de crecimiento del pelo. Varias familias de proteínas se expresan en el crecimiento del cabello y se estima que entre 50-100 proteínas constituyen la fibra final de pelo (Rogers GE & Powell BC., 1993). La formación del folículo piloso y su crecimiento cíclico, la quiescencia y la regeneración dependen de la señalización recíproca entre sus componentes epidérmico y dérmico. El centro dermal de organización, la papila dérmica (DP), regula el desarrollo del folículo epidérmico y depende de las señales de la epidermis para su desarrollo y mantenimiento.

El ciclo del pelo representa un modelo notable para los estudios de la regulación de la quiescencia y la activación de las células madre, así como la proliferación celular de tránsito-amplificación, la elección del destino celular, la diferenciación y la apoptosis en un tejido epitelial adulto regenerativo (Alonso L & Fuchs E., 2006).

El ciclo de crecimiento del pelo consta de tres fases: fase anágena o de crecimiento, fase catágena o involución y fase telógena o de reposo.

Fase anágena: es la fase más larga, presenta una duración aproximada de 1000 días, en esta fase se encuentra la mayoría del pelo, entre un 80 a 85%, es altamente activo, tiene una replicación celular similar al sistema hematopoyético, lo que explica el por qué es muy sensible a las deficiencias alimentarias y a la quimioterapia. En esta fase el pelo se encuentra firmemente adherido lo que dificulta su estudio directo en la prueba de estiramiento o tracción, la parte del bulbo se localiza en el tejido adiposo y su tamaño es constante.

Fase catágena: es la fase más corta con una duración aproximada de 10 días o de 2 a 3 semanas y representa menos del 1% del pelo lo que dificulta obtenerlo para su estudio.

Fase telógena: también se le conoce como fase de descanso o reposo, tiene una duración aproximada de 100 días, representa de un 10 a 15% del pelo. En esta fase el bulbo piloso es amelánico, y se desprende con facilidad a la mínima tracción, en fases tardías se cae al peinarse o se desprende solo (Suro-Reyes et al., 2007).

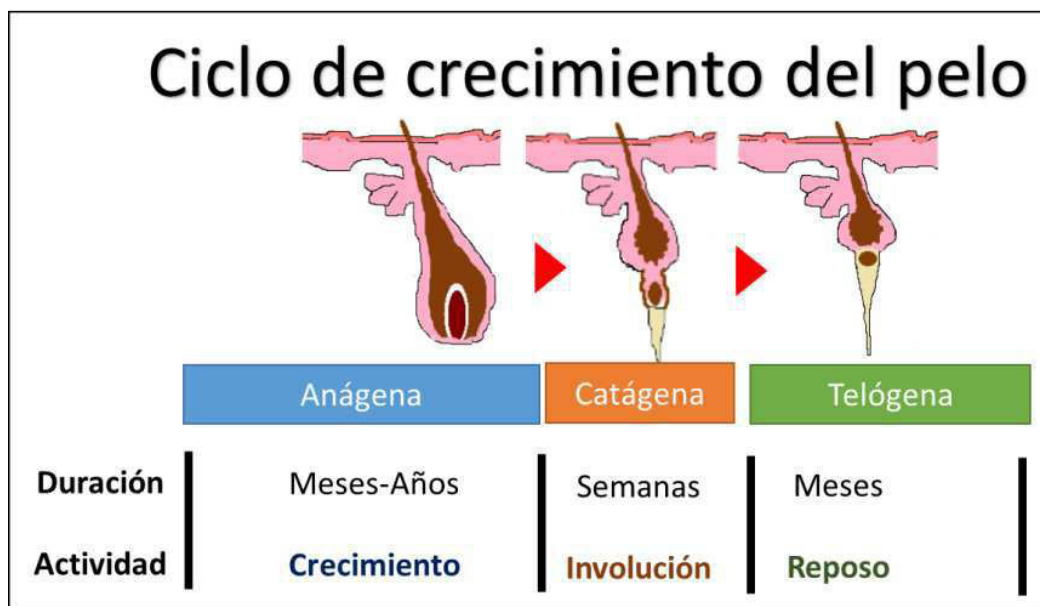


Figura 1. Ciclo de crecimiento del pelo.

1.2 Embriología

El pelo deriva del ectodermo, mientras que el músculo erector del pelo del mesodermo. En el humano el desarrollo del pelo comienza en la novena semana de gestación, pero es hasta la semana 23 aproximadamente cuando este se hace perceptible. En los fetos humanos los primeros folículos pilosos primordiales están distribuidos principalmente en las cejas, el labio superior y el mentón. La mayor parte de los folículos pilosos restantes comienzan a desarrollarse entre el cuarto y quinto mes de gestación en dirección cefalocaudal. (Hadshiew IM1, Foitzik K, Arck PC & Paus R., 2004). La

mayoría, si no todos, los folículos pilosos están presentes en el quinto mes y se cree que no se forman nuevos folículos pilosos tras el nacimiento. Se desarrollan unos 5 millones de folículos pilosos en el hombre y en la mujer. Las diferencias entre ambos sexos, respecto a la distribución de los diferentes tipos de pelo vienen determinadas por las distintas concentraciones de esteroides sexuales circulantes (Hadshiew IM, Foitzik K, Arck PC & Paus R., 2004).

En la piel del feto, la morfogénesis del FP comienza a partir de un capullo en la epidermis, justo por arriba de una condensación de mesénquima que rápidamente progresa a la generación de la unidad pilosebácea madura y multicilíndrica. (Irvin Freedberg et al., 2005).

1.3 Morfogénesis del folículo piloso

La morfogénesis del folículo piloso se divide en tres etapas: inducción, organogénesis y cito-diferenciación.

Inducción: En esta etapa se presenta la primera señal dérmica, que produce un campo morfogenético en la epidermis para formar la placoda. En este proceso participan genes promotores e inhibidores de la inducción folicular, como miembros de la familia WNT y β -cateninas.

Organogénesis: Posteriormente, la placoda emite una señal para promover el agrupamiento de células mesenquimales que forman un condensado dérmico. Este grupo de células envía señales al epitelio folicular que inducen la proliferación y la movilización descendente de una columna de células epiteliales dirigidas hacia la dermis (segunda señal dérmica). A esta estructura la rodean células epiteliales foliculares para formar la papila folicular.

Cito-diferenciación: al final se lleva a cabo la diferenciación de la vaina reticular interna y el tallo piloso, en este proceso intervienen múltiples proteínas. La vaina reticular interna está formada por queratinocitos diferenciados que se agrupan y forman un tubo rígido, el cual da origen al tallo piloso.

En cada etapa intervienen diferentes tipos de proteínas que al final constituyen la cito-diferenciación definitiva, a partir de la cual se desarrolla el FP (Guzmán-Sánchez, 2010).

1.4 Anatomía del folículo piloso

El folículo piloso (FP) está formado por múltiples estructuras. Consta de un segmento inferior y uno superior, ambos dentro de la piel (epidermis y dermis). El segmento inferior tiene dos secciones, bulbo y tallo. El bulbo se extiende desde la base de la papila folicular, también llamada papila dérmica, hasta el área conocida como franja de Adamson (donde termina la zona queratogénica del pelo); el tallo abarca desde la franja de Adamson hasta el sitio de inserción del músculo erector del pelo (figura 2). En el interior del bulbo se encuentra la papila folicular, y en ella, células madre, melanocitos, melanosomas, y capilares arteriales y venosos que nutren al pelo. El segmento superior se divide en dos porciones: istmo e infundíbulo. El primero, se extiende desde el sitio de inserción del músculo erector del pelo hasta la glándula sebácea; y el infundíbulo, desde la glándula sebácea hasta donde emerge el pelo propiamente dicho a la superficie de la piel (Figura 1). Las capas que cubren al bulbo y al tallo desde su interior hacia el exterior son el tallo (que lo forman las células medulares), corteza del tallo, cutícula del tallo y vaina radicular interna (VRI), que a su vez consta de tres capas: cutícula de la VRI, capa de Henle y capa de Huxley. La siguiente capa que recubre a la anterior es la vaina radicular externa (VRE), a la cual

sigue el estrato basal (que corresponde a la invaginación de epidermis) y por último la membrana vítrea (Figura 2). Tanto el bulbo como el tallo están rodeados por las capas que mencionamos; sin embargo, el tallo no tiene capilares. Las células más importantes del pelo son melanocitos, queratinocitos y células madre. Los melanocitos se encuentran en la papila folicular, matriz del pelo y VRE. Los queratinocitos se encuentran en la capa más externa del pelo (estrato basal). Aquí también se encuentran células madre que producen queratinocitos y melanocitos, así como en la papila folicular. La papila folicular produce células que se diferencian hasta transformarse en el tallo piloso, el cual crece progresivamente y forma el pelo terminal. El diámetro del tallo piloso mide entre 50 y 120 μm . En las personas de ascendencia asiática es más grueso, y en las caucásicas, más delgado. La longitud del pelo va de 1 mm a 50 cm.¹

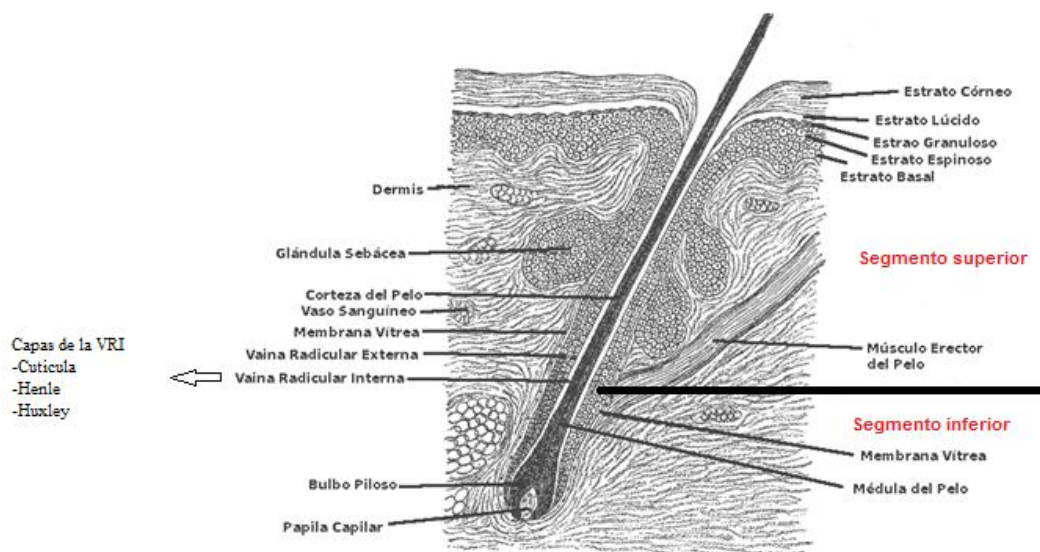


Figura 2. Folículo Piloso. Tomado del libro Anatomía de Grey.

1.5 Alopecia Androgenética

La alopecia es la pérdida de pelo que puede o no acompañarse de una cicatriz visible o microscópica. Existen dos tipos de alopecias: no cicatriciales y cicatriciales. La Alopecia androgenética es una alopecia no cicatricial y corresponde a la forma más común de pérdida de cabello en humanos, y afectando al 80% de los hombres europeos a la edad de 80 años (Heilmann et al., 2013), según datos del IMSS el 50% de los hombres mexicanos entre 18 y 49 años presentan AAG. También se presenta en mujeres como calvicie de patrón femenino (Kaufman, 2002). En la AAG se observa un patrón característico de pérdida de cabello, que involucra la recesión bitemporal de la línea frontal del cabello, seguido de adelgazamiento difuso sobre el vértex, con el tiempo se produce una pérdida total del cabello en el centro del vértex, lo que lleva a la producción de un parche de calvicie, el cual se une a la línea frontal del cabello que retrocede, dejando atrás una isla de cabello en el cuero cabelludo frontal. Finalmente, esta isla también desaparece y sólo permanece el cabello parietal y el cabello occipital (Sinclair, 1998). Se ha sugerido que las diferencias regionales en la pérdida de cabello pueden ser causa de diferencias en los patrones embriológicos del cuero cabelludo, así como a la cantidad de receptores de andrógenos (Mirmirani et al., 2014). La escala de Hamilton-Norwood ha sido la más utilizada para evaluar tanto el grado como la severidad de la AAG en hombres (Guarrera et al., 2009), mientras que en las mujeres se utiliza la escala de Ludwig.

La AAG ha sido asociada con patologías como hiperplasia benigna de próstata y cáncer de próstata, enfermedad coronaria, síndrome metabólico y arteriosclerosis (Giles et al., 2002; Trieu et al., 2014; Arias-Santiago et al., 2009). De hecho, recientemente se encontró una asociación entre el aumento del índice de masa corporal (IMC) y la AAG (Yang et al., 2014). Mientras que la AAG en mujeres ha sido asociada

con la presentación de ovario poliquístico (Cela et al., 2003), así como a una disminución en los niveles séricos de ferritina (Kantor et al., 2003). Factores exógenos como altos niveles de vanadio en sangre y disminución de soya en la dieta fueron asociados con AAG en una comunidad de Taiwán (Lai et al., 2013).

1.5.1 Clasificación clínica

Hamilton fue el primero en clasificar la severidad de la AAG en 1951, usando una escala del I al VII que fue posteriormente modificada por Norwood, quien subclasificó varios de los estadios. En la actualidad la escala Hamilton-Norwood (escala HN, Figura 1) es la más utilizada y aceptada para evaluar clínicamente a los pacientes con AAG, especialmente para los ensayos terapéuticos o para establecer su asociación con otras enfermedades importantes como la enfermedad isquémica del corazón y el cáncer de próstata, ya que permite de manera gráfica valorar el sitio y el grado de la afección (Hamilton JB, 1951).

La clasificación según la escala de Hamilton-Norwood puede resumirse de la siguiente manera:

- a) **Tipo I – II:** Calvicie inicial: frontal localizada y frontal generalizada.
- b) **Tipo III – IV:** Calvicie moderada se sitúa en el área anterior y vértex o coronilla y la parte superior de la cabeza.
- c) **Tipo V:** Calvicie amplia o avanzada con una caída extensa con persistencia de límites.
- d) **Tipo VI- VII:** Calvicie severa y pérdida generalizada del pelo.

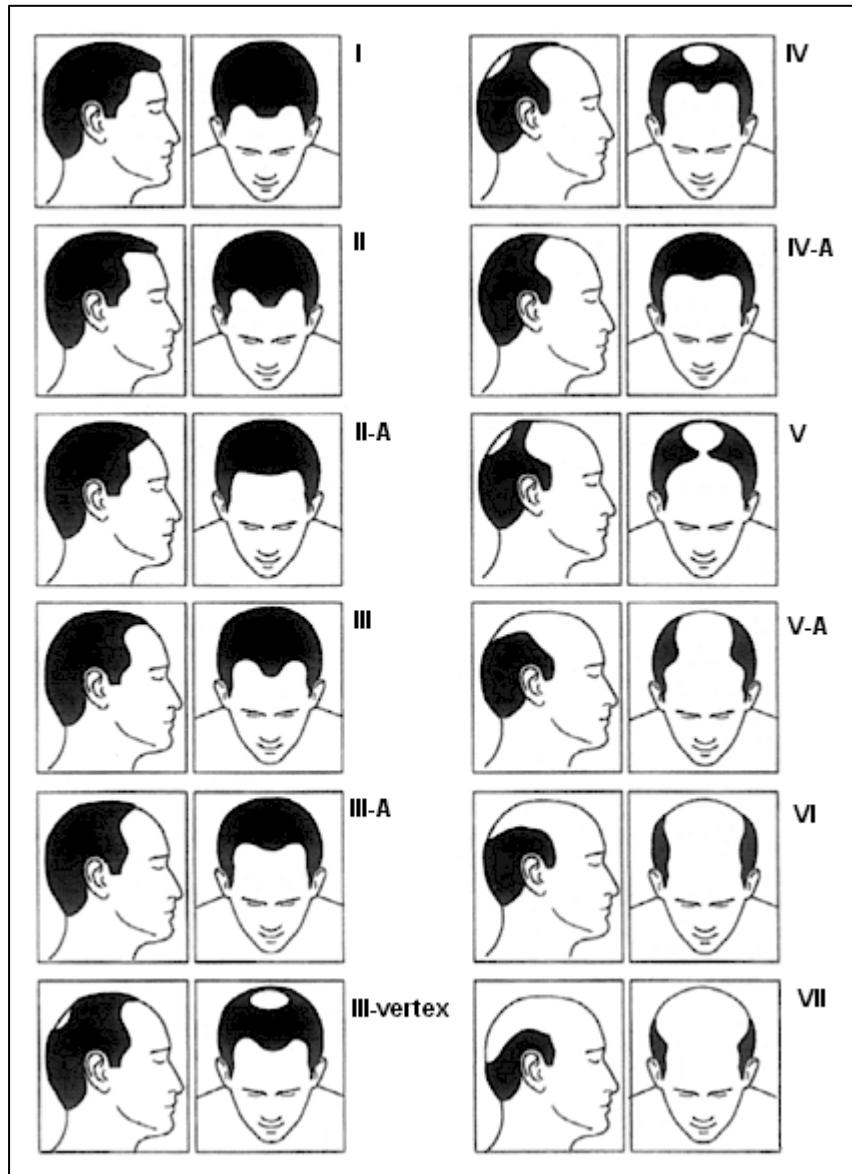


Figura 3. Clasificación clínica de AAG según la escala de Hamilton-Norwood.

1.5.2 Etiología

La patogénesis de la AAG es manejada por andrógenos y la predisposición genética como principales prerequisites. Esta afección presenta un patrón de agregación familiar; es decir puede presentarse en varios individuos de una familia sin presentar un claro patrón de herencia mendeliana. De hecho, los estudios en gemelos han mostrado una heredabilidad de 0.81, lo cual deja en claro que el efecto genético juega un papel importante en la presentación y progresión de la AAG (Nyholt et al., 2003).

1.5.3 Fisiopatología

Cada cabello se origina en un folículo piloso y el crecimiento de este no se lleva a cabo de manera definida sino a través de un proceso cíclico denominado ciclo de crecimiento del cabello, este ciclo consta de 3 fases: 1) Fase anágena o de crecimiento, es la fase más larga y dura de 2 a 7 años, 2) fase catágena o de transición, la cual dura aproximadamente 2 semanas, en la cual hay una involución del folículo piloso debido a la apoptosis y 3) fase telógena o descanso, de aproximadamente 12 semanas, en la cual se elimina el cabello antiguo.

La miniaturización del folículo se produce principalmente por el efecto de los andrógenos, en este proceso se reduce gradualmente el tamaño del folículo produciendo así un cabello más fino con cada sucesivo ciclo del cabello (Sinclair et al., 1998).

1.5.4 Efecto de los Andrógenos

Fue en 1942 cuando Hamilton basado en evidencias clínicas demostró que la calvicie de patrón masculino estaba mediada principalmente por andrógenos (Hamilton, 1942). Desde entonces, se ha supuesto que la AAG es el resultado de una sensibilidad anormal de los folículos pilosos del cuero cabelludo a los andrógenos circulantes (Kaufman, 2002), la cual puede ser debida a un aumento en el número de receptores de andrógenos (Sinclair, 1998), así como a la acción de la enzima 5 α -reductasa tipo 2, la cual cataliza la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT) un andrógeno que se une con mayor avidez al receptor de andrógenos (Kaufman, 2002). Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente de las acciones relacionadas con andrógenos sigue siendo en gran parte desconocido (Midorikawa, Chikazawa, Yoshino, Takada, & Arase, 2004)

1.5.5 Histología

Domyati observó que en cortes transversales de biopsias en sacabocado de pacientes con AAG, existe una miniaturización progresiva de los folículos terminales, lo que se traduce en una reducción en el tamaño del folículo y un adelgazamiento del grosor del cabello. Además, demostró una disminución en la relación entre el cabello terminal y el cabello inmaduro (vello) de 2.3:1, el cual mostró una diferencia significativa comparada con los controles (relación 7:1). Los cortes transversales de las biopsias mostraron la presencia de fibrosis e infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de linfocitos e histiocitos, localizados principalmente a nivel de la porción superior del folículo. También se observó que las glándulas sebáceas estaban aumentadas de tamaño, presentaban una mayor cantidad de lóbulos y se encontraban en mayor cantidad.

En este mismo estudio, se realizaron tinciones de inmunohistoquímica para colágeno tipo I, donde se observó que se encontraba en mayor cantidad a nivel perifolicular y era más abundante en casos en donde los pacientes tenían edades más avanzadas

1.5.6 Tratamiento

Actualmente hay dos medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para la regeneración del cabello y la reversión de la miniaturización del folículo en pacientes con AAG: minoxidil tópico y finasteride oral. El Finasteride revierte el daño a través de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo II bloqueando la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (Price et al., 2002); mientras que el mecanismo de acción del minoxidil en la AAG aún no está clara, aunque se cree que es independiente de su acción vasodilatadora (Mirmirani et al., 2014).

En un estudio reciente se mostró que la aplicación tópica de ácido valproico produce un aumento en la cantidad de cabello en pacientes masculinos con AAG (Jo et al., 2014).

Otra alternativa en la terapia para AAG fue probada por Satino & Markou, 2003, utilizando bajos niveles de terapia laser por 6 meses (HairMax LaserComb), observando aumento en la tanto en la cantidad de cabello como de la resistencia a la tracción tanto en la región temporal como en el vértex en hombres y mujeres. Por otra parte, se han llevado a cabo diferentes estudios piloto para probar los efectos de la inyección de plasma rico en plaquetas autólogo activado (PRP-AA) en pacientes con AAG, mostrando beneficios en estos pacientes (Cervelli et al.2014; Schavione et al.2014). También se ha reportado la eficacia y seguridad de la administración de antioxidantes tópicos y sistémicos en el tratamiento de las alopecias femenina y masculina. Los antioxidantes tópicos incluyen: biotina (vitamina B8) y melatonina. Los antioxidantes sistémicos son: omega, biotina (vitamina B8), L-cistina, piridoxina (vitamina B6), vitamina C, melatonina, soya, cinc, hierro, taurina y metionina.

Las técnicas invasivas como cirugía y el trasplante de cabello también están siendo utilizadas para tratar la AAG.

1.7 Genética y AAG

Aunque es conocido que la AAG es mediada por andrógenos, la predisposición genética también juega un importante papel. La genética de la AAG es compleja, siendo uno de los principales genes candidatos el receptor de andrógenos (RA), sin embargo; no se excluye una probable contribución poligénica (Sinclair et al., 1998).

1.7.1 Asociación del cromosoma X con AAG

Durante años se ha propuesto que los genes implicados en AAG están ligados al cromosoma X. Recientes estudios de asociación de genoma completo han identificado una fuerte señal de asociación en este cromosoma con AAG. De hecho, el gen del receptor de andrógenos (RA) y el gen del receptor de ectodisplasia A2 (*AR/EDA2R*) mostraron una fuerte señal de asociación con AAG en este cromosoma. Sin embargo, el gen del receptor de andrógenos es el principal gen candidato asociado con AAG (Heilmann et al., 2013).

Diferentes esfuerzos se han realizado para determinar si el gen del receptor de andrógenos se asocia con la calvicie de patrón masculino, Ellis et al. 2001 compararon las frecuencias alélicas de 2 polimorfismos en el exón 1 del gen del receptor de andrógenos: 1) Sitio de restricción con *Stu I* y 2) polimorfismos de repetición de los tripletes CAG y GGC. En este estudio encontraron que el sitio de restricción con *Stu I* estaba presente en el 98.1% de los hombres jóvenes con calvicie y en el 92.3% de los hombres mayores con calvicie, mientras que en los sujetos sin calvicie se observó en un 76.6%. La combinación de menor cantidad de repetidos trinucleótidos fue más frecuente en los hombres con calvicie ($p=0.03$). Lo anterior sugiere que estos marcadores están muy cerca de una variante funcional que es un componente necesario de la determinación poligénica de la calvicie de patrón masculino (J. Ellis, Stebbing, & Harrap, 2001). En el 2005, Hillmer et al, replicaron este trabajo, mostrando que el principal candidato para conferir un efecto en AAG es el repetido de poliglicina GGN(Hillmer et al., 2005). Sin embargo, Ellis et al.(2007), encontraron que estos repetidos de poliglicina no confieren susceptibilidad para el desarrollo de AAG(J. Ellis et al., 2007). Para reforzar la implicación del cromosoma X en la AAG, Prodi et al. (2008), realizaron un estudio de casos y controles de asociación en el cromosoma

X, en el cual los genes RA y EDA2R (Xq11-q12) mostraron una fuerte asociación con AAG. Sin embargo, el SNP rs1385699 localizado en EDA2R reflejo la mejor señal de asociación ($P=3.9 \times 10^{-19}$), mientras que rs6152 localizado en RA se mostró con menor significancia ($P=4.17 \times 10^{-12}$). El papel de EDA2R en AAG aún no está definido. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que la asociación de los marcadores en EDA2R y AR parece ser el resultado de desequilibrio de ligación (Prodi et al., 2008). Por lo tanto, con la localización del AR en el cromosoma X y la fuerte señal de asociación de EDA2R se resalta la importancia de la línea materna en la herencia de AGA (Hillmer et al., 2005).

1.7.2 Loci de riesgo para AAG en Autosomas

Recientemente, Heilmann et al.2013, sugieren un componente poligénico para AAG, el cual puede estar implicado en la complejidad de vías biológicas asociadas con AAG (Heilmann et al., 2013).

Como resultado de un meta-análisis, Li et al.2012, identificaron 6 nuevos loci de riesgo para AAG en 1p36.22, 2q37, 7p21.1, 7q11.22, 17q21.31 y 18q21.1; en este estudio también encontraron una fuerte asociación en 20p11 y el locus del cromosoma X que alberga al gen del receptor de andrógenos(RA). Más recientemente, Heilmann et al.2013, identificaron 4 loci de riesgo para AAG, localizados en 2q35, 3q25.1, 5q33.3, y 12p12.1 (Heilmann et al., 2013), la señal más fuerte de asociación se observó en 2q35, este locus alberga el gen *WNT10A* el cual podría estar implicado en la etiología de la AAG, al mostrar un efecto genotípico en la expresión del mismo en folículo piloso.

El loci de riesgo para AAG en 20p11 identificado previamente por Li et al.2012, fue identificado también en población china con AAG (Liang et al., 2013). Mientras que en la población alemana con AAG se identificó un locus de riesgo en 3q26 (Hillmer

et al., 2008). Así, la identificación de nuevos genes de susceptibilidad en estos loci autosómicos, sugiere que vías no andrógeno-dependientes también están involucrados en la etiopatogenia de AAG(Rathnayake & Sinclair, 2010)(Tabla 1).

Tabla 1. Loci autosómicos asociados con AAG.

Cromosoma	Variante	P value	^a Genes	^b Efecto	Autor
1p36.22	<i>rs12565727</i>	<i>9.07x10-11</i>	<i>TARDBP</i>	No	(Li et al., 2012)
2q35	<i>rs7349332</i>	<i>*3.55x10-15</i>	<i>WNT10A</i>	Sí	(Heilmann et al., 2013)
2q37.7	<i>rs9287638</i>	<i>1.01x10-12</i>	<i>HDAC4</i>	No	(Li et al., 2012)
3q25.1	<i>rs4679955</i>	<i>*1.70x10-10</i>	<i>SUCNR1-MBNL-1</i>	No	(Heilmann et al., 2013)
5q33.3	<i>rs929626</i>	<i>*2.12x10-12</i>	<i>EBF1</i>	No	(Heilmann et al., 2013)
7p21.1	<i>rs2073963</i>	<i>1.08x10-12</i>	<i>HDAC9</i>	No	(Li et al., 2012)
7q11.2	<i>rs6945541</i>	<i>1.71x10-9</i>	<i>AUTS2</i>	No	(Li et al., 2012)
12p12.1	<i>rs9668810</i>	<i>*1.09x10-10</i>	<i>SSPN-ITPR2</i>	No	(Heilmann et al., 2013)
17q21.31	<i>rs12373124</i>	<i>5.07x10-10</i>	---	No	(Li et al., 2012)
18q21	<i>rs10502861</i>	<i>2.62x10-9</i>	<i>SETBP1</i>	No	(Li et al., 2012)
20p11	<i>rs6047844</i>	<i>1.71x10-39</i>	<i>PAX1,FOXA2</i>	Sí	(Li et al., 2012)

^a Gen que contiene el SNP o cercano a él. ^b Expresión de los genes en folículo piloso. *Resultados de un análisis combinado.

1.8 Antecedentes

Son relativamente pocos los estudios realizados en alopecia androgenética haciendo uso de técnicas de biología molecular, siendo una de las principales limitaciones la obtención de biopsias de cuero cabelludo para realizar estos estudios. En el 2004, Midorikawa et al, realizaron un análisis de expresión de células de papila dérmica de la región afectada y la región occipital de pacientes con AAG, observando una expresión diferencial de 107 genes, destacando la función de *BMP2* y *EphrinA3* como promotores del crecimiento del cabello (Midorikawa et al., 2004).

Garza et al, 2012; realizaron un análisis de expresión global con microarreglos de biopsias de la región de calvicie y de la región occipital en 5 pacientes con AAG. En este estudio, se encontraron 250 transcritos diferencialmente expresados. Sin embargo, solo la sobreexpresión de PGDS en la región de calvicie, resulto relevante. De esta manera, los autores sugieren que el producto de la PGDS, la PGD2, inhibe el crecimiento del cabello por inducción prematura de la fase catagéna (Garza, Liu, & Yang, 2012). Sin embargo, Heilmann et al. 2013, discuten que no hay soporte genético para la contribución de las prostaglandinas a la etiología de la AAG. Esto, ya que en los estudios de GWAS no han mostrado señal de asociación cerca de estos genes (PGDS, PGD2).

Mirmirani et al, 2014, encontraron una expresión diferencial de 38 genes entre el cuero cabelludo del vértex y la región frontal de 16 pacientes con AAG. Entre los genes sobre-expresados se encuentran *MSL3L2*, *CD209*, *MUC7*, *SLC6A14* y *ANKRD20B*. Mientras que en los genes sub-expresados se encuentran *DUSP1*, *FOS*, *FOSB*, *CYR61*, *HBB*, *EGR1*, *ZFP36*, *MS4A1*, *IGLI3*, *ATF3*, *PSG3*, *EFCAB4B*, *KRTAP*, así como RNAs no codificantes. Con estos resultados lo autores sugieren una firma de expresión para cada una de estas regiones.

Mediante técnicas de proteómica, Moon et al 2013, identificaron las proteínas presentes en células de papila dérmica tanto de la región afectada como de la no afectada por calvicie en dos pacientes con AAG. En este estudio encontraron 128 proteínas sobre-expresadas y 12 sub-expresadas en la región de calvicie de un total de 690 proteínas identificadas. Entre las proteínas sobre-expresadas se identificó a la argininosuccinato sintetasa 1 (ASS1), la proteína asociada al citoesqueleto (CKAP4), la gelsolina (GSN), entre otras, las cuales se confirmaron por western blot o inmunofluorescencia. Así, los autores sugieren que la expresión alterada de estas proteínas puede estar involucrada en la etiología de la AAG (Moon et al.2013).

Otra aproximación al entendimiento de la AAG, fue determinar la diferencia en la expresión proteica de factores de crecimiento / citoquinas en muestras de cuero cabelludo de calvicie y muestras de cuero cabelludo de región sin calvicie de los mismos individuos afectados con AAG mediante la técnica de ELISA (Panchaprateep, Korkij, & Asawanonda, 2011). En este estudio, se encontró una sobreexpresión de las proteínas *BDNF* (Brain-derived nerve factor), neurotrofina-3 y factor de crecimiento del nervio- β .

Recientemente, Chew et al, realizaron un análisis de transcriptoma de la región afectada y occipital en 20 pacientes con AAG y encontraron 1339 transcritos diferencialmente expresados a un valor de $p < 0.05$. Se observó una gran heterogeneidad transcriptómica entre las muestras identificando 3 clusters. En el clúster I se identificó una mezcla de muestras de todos los sitios anatómicos, lo que sugiere que las muestras de la región del vértex en el grupo I es probable que sean menos avanzado en AAG, ya que su perfil de transcriptoma es más similar a las muestras control. El clúster II consistente en cinco muestras de vértex de los controles y seis muestras de la región occipital de los controles, mientras que el clúster III

contiene únicamente muestras de la región de vértex o calvicie con folículos miniaturizados, por tanto, los cabellos representan AAG avanzada.

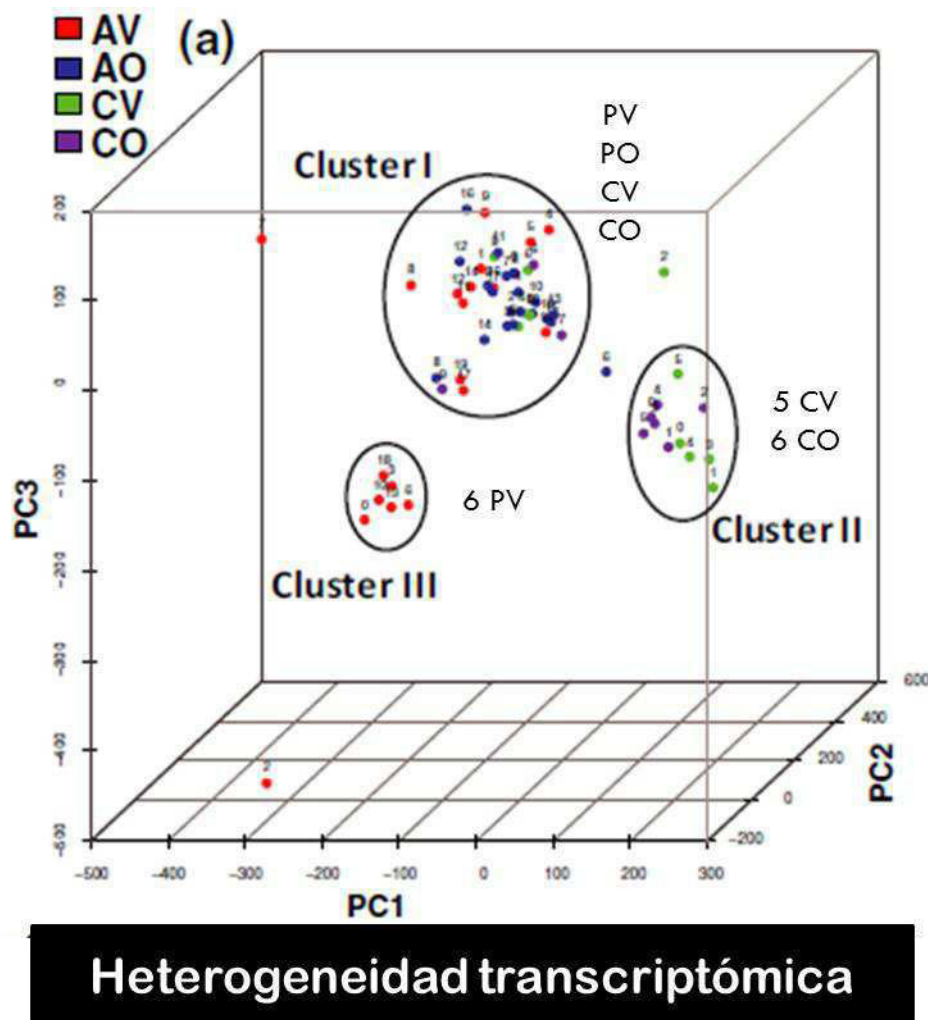


Figura 4. Gráfico de componentes principales de las muestras de AAG y controles del estudio de Chew et al.2017. Tomado y modificado de Chew et al.2017.

Entre los transcritos diferencialmente expresados identificados por Chew et al.2017, se encuentran los siguientes genes de interés: *CYB5R3*, *FADS2*, *INSR*, *PTGDS*, *GPX4*, *PRDX3* y *SRD5A1*. La sobre-expresión de los genes de la cadena respiratoria *CYB5R3* e *INSR* puede afectar el estado redox en los cabellos afectados por AAG. Mientras que

la sobreexpresión de los genes anti-oxidación *GPX4* y *PRDX3* sugiere que el cuero cabelludo de la región del vértex de los pacientes puede estar expuesto a un mayor estrés oxidativo que el cuero cabelludo control. El gen *PTGDS* reportado por Garza et al., 2012, presentó el mismo patrón de expresión en las muestras de AAG de este grupo. Mientras que la sobre-expresión de *SRD5A1* confirma la participación de esta enzima en la presentación de la AAG.

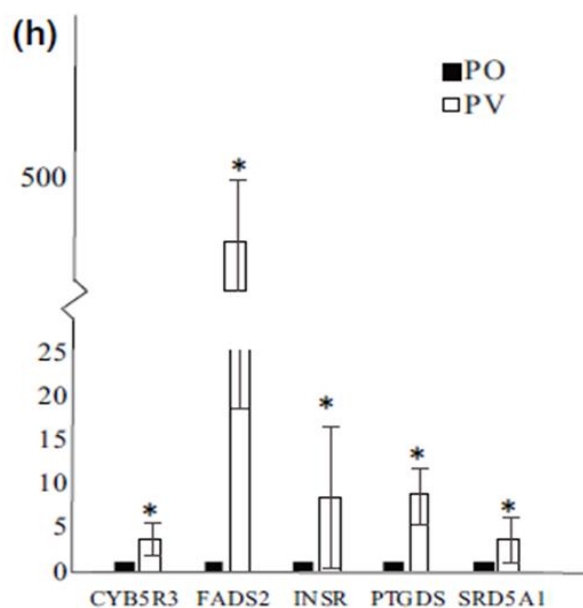


Figura 5. Genes diferencialmente expresados en la región de vértex y occipital de los pacientes con AGA. La validación por RT-qPCR mostró que la expresión normalizada con RPL13A de CYB5R3, FADS2, PTGDS, SRD5A1 y SDHA fueron mayor en PV en comparación con PO, respectivamente. N = 3, prueba de rango firmada por Wilcoxon, $p < 0,05$. Chew et al., 2017.

1.7.4 Metilación del ADN

Recientemente, se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos que conllevan modificaciones de las histonas o del ADN modulan la accesibilidad de los genes a la maquinaria transcripcional y de este modo, se regulan las actividades de genes sin tener que cambiar la secuencia de ADN genómico (Goldberg et al., 2007). El término

epigenética ha sido definido como "los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN." Por lo tanto, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales (Rodríguez Dorantes et al., 2004).

1.7.4.1 Metilación del ADN en mamíferos

La metilación del ADN ocurre en los dinucleótidos CpG y es catalizada por una familia de ADN metiltransferasas (DNMTs) conformada por DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT4, las cuales transfieren un grupo metilo del S-adenil metionina (SAM) al quinto carbono de un residuo de citosina para formar 5Mc (figura 6). En mamíferos, la metilación del ADN y su significado funcional es un área activa de investigación. Este proceso afecta las interacciones ADN-proteína, puede alterar la estructura y replicación del ADN, la expresión de los genes y la diferenciación celular, la latencia de virus celulares, y la inactivación transcripcional de elementos genéticos móviles, además de aumentar el riesgo de mutaciones espontáneas; lo que hace de este tema un tópico de gran relevancia médica (Rodríguez Dorantes et al., 2004). La gran mayoría de las 5-metilcitosinas (5mC) en el ADN de los mamíferos se encuentran presentes en los dinucleótidos -CpG-35' y en su cadena complementaria en el dinucleótido 35'-GpC-55'. Otras secuencias no CpG como 55'- CpNpG-35' o no simétricas como 55'-CpA-35' y 55'-CpT-35', también pueden estar metiladas pero con menor frecuencia (Costello JF, Plass C., 2001)

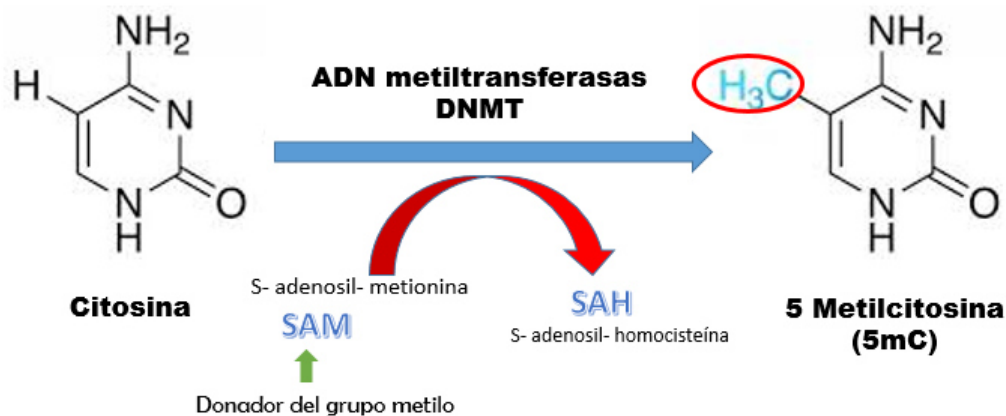


Figura 6. Metilación del ADN.

La metilación del ADN ocurre en el carbono 5 de la citosina, en este proceso recibe un grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina (SAM) por acción de las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs).

La 5mC constituye solo el 1% del total de las bases del ADN en las células somáticas humanas y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN, lo cual podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, y ya se ha mostrado evidencia de que existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica. Recientes investigaciones sugieren que la relación entre la metilación del ADN y la transcripción puede ser aún más compleja, la metilación en el cuerpo del gen y la metilación en los sitios no CpG a menudo han sido asociados con la activación de la expresión del gen así como al splicing alternativo en invertebrados.

Por otro lado, el análisis bioinformático del genoma humano predice cerca de 29,000 islas CpG. Las islas CpGs, según los criterios de Gardiner-Garden, son definidas como regiones genómicas de aproximadamente 1 kb de longitud con un contenido de G+C $\geq 50\%$ con una razón de CpG observados/esperados $\geq 0,6$, las cuales se sobrelapan con

las regiones promotoras del 60 al 70% de todos los genes humanos, aunque también es posible encontrarlas en menor medida en los exones o en las regiones intergénicas (Gardiner-Garden M and M Frommer., 1987). Se ha demostrado que la gran mayoría de las islas CpG no están metiladas en todos los estados del desarrollo ni en todos los tipos de tejidos, lo anterior aplica aún para islas CpG localizadas en genes que presentan un patrón de expresión tejido específico, tal es el caso de los genes que codifican para las cadenas α de la hemoglobina y para las cadenas α -2 de la colágena tipo 1 y poseen islas CpG que se mantienen desmetiladas en todos los tejidos estudiados. Una pequeña pero significativa proporción de estas islas CpG puede mantenerse libre de metilación hasta el momento en el cual el gen asociado es silenciado durante el desarrollo embrionario. Esto ocurre, particularmente, en algunos de los genes improntados y en los localizados en el cromosoma X inactivo de las mujeres (Rodríguez Dorantes et al., 2004).

1.7.4.2 Impronta Genómica

Se define a la impronta como el marcaje epigenético del genoma de un organismo diploide con respecto a su origen parental, esta afecta la expresión de algunos genes conocidos como improntados. Los genes improntados se caracterizan por la expresión de sólo uno de los alelos. La impronta corresponde a un mecanismo epigenético muy importante en los mamíferos y se ha relacionado en la regulación de la transferencia de nutrientes de la madre al feto y al recién nacido. La modificación epigenética más importante implicada en la impronta es la metilación en dinucleótidos CpG que define regiones con metilación diferencial (DMR, differentially methylated region), las cuales son específicas para cada alelo parental. Los genes improntados también pueden diferir con respecto a la estructura de la cromatina y al estado de acetilación y metilación de las histonas (Paulsen M, Ferguson-Smith AC., 2001). Las DMR pueden tener

propiedades distintas, algunas están metiladas en el alelo inactivo, mientras que otras lo están en el activo (Feinberg AP, 2000).

1.7.4.3 Metilación del ADN en las células normales y estados de enfermedad

Normalmente, la metilación del ADN tiene sus efectos primarios sobre la regulación génica durante el desarrollo embrionario, cuando puede afectar la expresión génica de todo el organismo, y en la diferenciación, donde su papel se restringe a tipos específicos de tejidos. Con respecto al efecto de la metilación del ADN en la expresión genética de todo el organismo, esto ocurre principalmente en el contexto de la transmisión germinal de estados epigenéticos hereditarios. El papel principal de la metilación del ADN en mamíferos en la línea germinal es asegurar la expresión de un solo alelo de genes específicos basados en el patrón de origen, fenómeno conocido como impronta. En mamíferos, una falla en la metilación o "impronta" del alelo parental correcto conduce a un espectro de enfermedades, incluyendo los síndromes de Silver-Russell, Beckwith-Wiedemann y Prader-Willi.. Dos de las enfermedades mejor caracterizadas relacionadas con la impronta son el síndrome de Angelman y el síndrome de Prader-Willi (PWS). El síndrome de Angelman es un trastorno neurogenético caracterizado por un déficit intelectual grave y rasgos dismórficos faciales distintivos. Se han descrito diferentes mecanismos genéticos que pueden causar el síndrome de Angelman, como una delección de la región crítica 15q11.2-q13 (60–75%), disomía uniparental paterna (2–5%), defectos de impronta (2–5%) y mutaciones en el gen UBE3A (10%) (OMIM: 105830). Por otra parte, el síndrome de Prader-Willi (PWS) es un trastorno metabólico causado por defectos genéticos y sus características son la baja estatura, retraso mental, tono muscular deficiente, e hiperfagia, lo que conduce a obesidad infantil (Adams J, 2008).

1.7.4.4 Metilación del ADN y Alopecia Androgenética

Son relativamente pocos los estudios realizados a la fecha para comprender el papel de la epigenética en el folículo piloso, así como su participación en el desarrollo de AAG.

Las modificaciones de la cromatina son importantes para la pluripotencia de las células madre embrionarias (ESC), pero sus funciones en las células madre adultas son menos claras (Millar SE, 2011).

Lien et al., 2011 definieron los patrones de metilación de histonas en las células madre del folículo piloso y mostraron que estos patrones difieren de las de las células madre embrionarias (ESC). Para demostrar esto, Lien et al., 2011 realizaron un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) -Seq para H3K27me3 y H3K4me3 usando células aisladas por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) a partir de la protuberancia del folículo piloso en reposo (población de protuberancia en reposo), protuberancia de anágeno temprana, y matriz anágena. Estos experimentos revelaron cómo la distribución global de H3K27me3 y H3K4me3 cambia a medida que las células madre progresan de la quiescencia a la activación y la formación de una población transitoria amplificadora in vivo.

Específicamente en AAG son muy escasos los estudios con enfoque en la búsqueda de patrones de metilación global para asociarlo a la patofisiología. Estudios recientes se han enfocado en la búsqueda de patrones de metilación de genes específicos como el gen del receptor de andrógenos (AR). Cobb et al., 2011. Realizaron un estudio para investigar los patrones de metilaciones en el gen del receptor de andrógenos en los folículos pilosos occipitales y en folículos afectados. Ellos observaron un aumento en la metilación del gen del AR en los folículos occipitales. Estos resultados sugieren que es posible que el aumento de la metilación del AR provea de protección a los folículos

pilosos occipitales contra la miniaturización y la pérdida de cabello el cabello. Otro estudio que proporciona un gran aporte al conocimiento del papel de la epigenética en AGA, es el realizado por Li et al., 2013. Ellos realizaron un estudio con ratones KO-DNMT1 tejido específico (piel), los cuales mostraron un fenotipo de alopecia. La enzima DNMT1 está implicada en el establecimiento y regulación de patrones de metilación de citosinas específicos de tejido. Lo cual sugiere que la actividad de este gen es importante para el desarrollo de esta enfermedad. Por lo tanto, debido a que son escasos los trabajos realizados a nivel molecular en la alopecia androgenética y los estudios realizados para investigar la epigenética son gen-específicos, resulta de interés conocer el perfil de metilación global en los pacientes con alopecia androgenética a fin de proveer otros genes que puedan involucrarse en esta patología.

Tabla 2. Diferentes técnicas empleadas para investigar AAG.

Hallazgo	Técnica	Muestra	Referencia
Polimorfismo-Sitio de restricción con <i>StuI</i> en el gen del RA	RFLP	SVP	(J. Ellis et al., 2001)
Repeticiones de trinucleótidos CAG y GGC gen del RA	Secuenciación Sanger	SVP	(J. Ellis et al., 2001)
Diferencia en la expresión proteica de Brain-derived nerve factor (BDNF)	ELISA	Cuero cabelludo de calvicie y sin calvicie.	(Panchaprateep et al., 2011)
Expresión diferencial (sobrexpresión) de PTGDS precursor de PGD2	Microarreglos	Cuero cabelludo de calvicie y sin calvicie.	(Garza et al., 2012)
Expresión diferencial de BMP2 y ephrin A3	Macroarreglos	Cultivo de células de papila dérmica de pacientes con y sin AAG.	(Midorikawa et al., 2004b)
Expresión diferencial (sobrexpresión) de miR-221, miR-125b, miR-106a y miR-410	mRAP y PCR-TR	Células de papila dérmica de cuero cabelludo de calvicie y sin calvicie	(Goodarzi & Abbasi, 2012)
Incremento en la metilación del gen RA en la región occipital de pacientes con AAG	Secuenciación conversión con bisulfito	Cuero cabelludo de calvicie y sin calvicie.	(J E Cobb et al., 2011)
CNV en el gen del RA	MLPA	SVP	(Joanna E Cobb, White, Harrap, & Ellis, 2009)
128 proteínas sobre-expresadas y 12 sub-expresadas	2D-LC-MS/MS	Células de papila dérmica de cuero cabelludo de calvicie y sin calvicie	(Moon et al., 2013)
Asociación de EDA2R/AR con AAG	Microarreglos	SVP	(Prodi et al., 2008)

En esta tabla se muestran algunos de los estudios moleculares más relevantes que tratan de dilucidar la etiología molecular de la Alopecia androgenética (AAG).

CAPÍTULO II

2.1 JUSTIFICACIÓN

La AAG es una entidad dermatológica con un componente genético complejo, el principal gen candidato ha sido el receptor de andrógenos, sin embargo, estudios recientes de GWAS han puesto en evidencia importantes señales de asociación en diferentes loci autosómicos. Sin embargo, son escasos los estudios realizados para definir la etiología de la AAG, y la mayoría de estos se ve limitado por el tamaño de muestra. A la fecha, se conocen 3 estudios de expresión global y no hay reportes de metilación global para esta entidad dermatológica.

Por lo tanto, realizar ensayos para comparar la expresión global y metilación del DNA en biopsias tanto de zona de calvicie como de la zona occipital (región no afectada por AAG) en un mayor número de muestra, puede llevarnos a la identificación de genes involucrados en la patofisiología de AAG para explicar mecanismos regulatorios de la misma y así como identificar genes como blanco terapéutico.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis de expresión y metilación global en pacientes con AAG para identificar genes involucrados en la patofisiología de esta entidad dermatológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Realizar análisis de expresión génica global en todas las muestras, mediante microarreglos e identificar genes diferencialmente expresados entre los grupos de estudio.
- 2) Realizar análisis de metilación global mediante secuenciación masiva e identificar los patrones de metilación en cada grupo de estudio.
- 3) Correlacionar de manera dirigida, la asociación entre los perfiles de expresión y metilación y seleccionar genes asociados al desarrollo de AAG.
- 4) Validar mediante qPCR los genes candidatos diferencialmente expresados en un grupo de sujetos con y sin AAG.

CAPÍTULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Diseño del estudio

Observacional, transversal, de casos y controles y experimental

4.2 Universo de estudio

El universo de estudio estuvo constituido por sujetos masculinos con Alopecia Androgenética. Esta muestra se obtuvo de pacientes que acudieron a consulta en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario en Monterrey, Nuevo León.

4.3 Muestra de estudio

Los pacientes fueron captados en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario, en un periodo comprendido entre Enero de 2014- Julio 2016.

4.4 Criterio de inclusión

- 1) Pacientes masculinos.
- 2) Asistan a la consulta del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario.
- 3) AAG: Afección III-VI en la escala Hamilton Norwood.
- 4) Edad de 18 a 65 años.
- 5) Sujetos que deseen participar en el estudio.
- 6) Sujetos que firmen el consentimiento informado.

4.5 Criterio de exclusión

- 1) Pacientes con enfermedades sistémicas (diabetes mellitus, hipertensión arterial).
- 2) Tratamientos sistémicos para las enfermedades sistémicas previamente mencionadas.

- 3) Tratamientos tópicos previos con minoxidil o aminexil en los últimos 6 meses.
- 4) Tratamiento oral para AAG en los últimos 6 meses.
- 5) Tratamiento sistémico para hiperplasia prostática en los últimos 6 meses.

4.6 Criterio de eliminación

- 1) Sujetos para los cuales la cantidad de muestra inicial (biopsia fresca) sea insuficiente.
- 2) Sujetos con datos clínicos incompletos.
- 3) Sujetos que deseen retirarse del estudio.

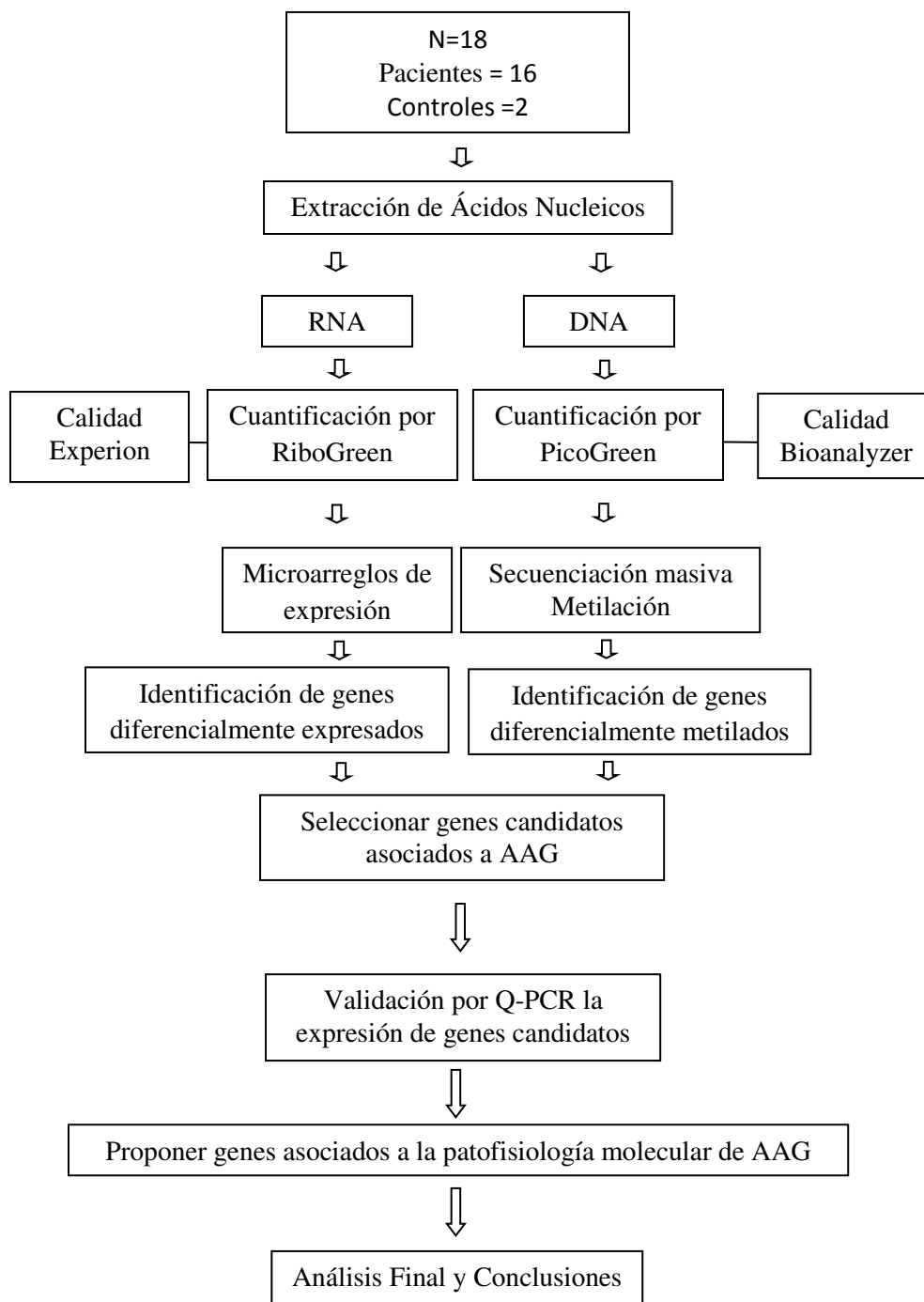
4.7 Criterios de inclusión del grupo control

- 1) Pacientes sin diagnóstico clínico de AAG.
- 2) Sujetos sin antecedentes familiares diabetes mellitus tipo 2, ni hipertensión arterial sistémica.
- 3) Sujetos sin tratamientos sistémicos para las enfermedades antes mencionadas.
- 4) Sujetos sin antecedentes familiares de AAG.
- 5) Pacientes que no hayan recibido tratamiento para caída de cabello en los últimos 6 meses.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia General



5.2 MATERIALES

5.2.1 Consumibles

- Viales de 1.2 mL Corning® cryogenic.
- Microtubos Eppendorf de 0.2, 0.7, 1.5 y 2 mL.
- Tubos Qubit para cuantificación.
- Tubos DNA LoBind de 1.5-mL (Eppendorf).
- Microtubos Covaris sample holders
- Placas de 96 pozos (AXYGEN).
- Placas de 96 pozos para PCR tiempo REAL.
- Films para cubrir las placas de 96 pozos (AXYGEN).
- Puntillas de pipeta de barrera de aerosol, libres de nucleasas, estériles.

5.2.2 Reactivos

Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

- RNALater (Ambion).
- DNeasy Blood and Tissue kit de QIAGEN.
- Isolate II Genomic DNA de Bioline.
- RNeasy Blood and Tissue Kit de QIAGEN.
- Kit QuantiT™ RiboGreen Assay (Invitrogen).
- Kit QuantiT™ PicoGreen Assay (Invitrogen).

Electroforesis

- Agarosa grado Biología Molecular marca BioRad
- Marcador de peso molecular EZ load(50µg/ml) marca BioRad
- Buffer de carga GelPilot 5X de QIAGEN

Microarreglos de expresión

- Gene Chip Human Genome U133 plus 2.0, Affymetrix (35)
- Kit de amplificación de microarreglos 1: 3' IVT Amplification Kit Module 1 (Affymetrix).
- Kit de Amplificación microarreglos 2: 3' IVT Amplification Kit Module 2 (Affymetrix).
- Controles poli A: GeneChip™ Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix).
- Controles de hibridación de microarreglos: GeneChip™ Hybridization Control Kit (Affymetrix).
- Lavado y tinción de microarreglos: GeneChip™ Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix).

PCR-Tiempo Real

- Taqman reverse transcription reagents (Invitrogen).
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific Inc).
- Taqman Universal pcr master mix, 2x5ml (Applied Biosystems).
- (4) Taqman gene expression assay 250 rxn (Applied Biosystems).
- Taqman fast advanced master mix (Applied Biosystems).

Análisis de metilación por secuenciación masiva

- SureSelectXT Human Methyl-Seq-Agilent
- SureSelectXT Human Methyl-Seq Capture Library
- EZ-DNA Methylation-Gold Kit

- DNA 1000 Kit (Agilent).
- High Sensitivity DNA Kit (Agilent).
- Nuclease-free Water (not DEPC-treated) Ambion.
- Buffer 1X TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) Life Technologies.
- Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter Genomics).
- Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies).
- Qubit BR dsDNA Assay Kit (Life Technologies).

5.2.3 Material Biológico

Se utilizaron 36 biopsias de cuero cabelludo obtenidas por punch 3-4mm en el Servicio de Dermatología del HU, las cuales se almacenaron en RNAlater para su transporte.

5.2.4 Equipo

1. Micropipetas Eppendorf.
2. Micropipetas multicanal Eppendorf.
3. Cámara de electroforesis marca BIO-RAD.
4. Fotodocumentador GelDoc XR BIO-RAD.
5. Espectrofotómetro NanoDrop 8000.
6. Experion™ Automated Electrophoresis System.
7. Agilent 2100 Bioanalyzer.
8. Separador magnético (Life Technologies).
9. Qubit Fluorometer (Life Technologies).
10. TissueLyser II – QIAGEN.

11. Termocicladores: termociclador Veriti y termociclador Geneamp 9700.
12. Centrifugas: Centrifuga refrigerada 54178R marca Eppendorf y centrifuga personal 5453 Eppendorf.
13. Ultrasonicador COVARIS S220.
14. Concentrador de vacío GeneVac.
15. Termo agitador comfort marca Eppendorf.
16. Estación de microarreglos de Affymetrix (GenChip Scanner, Fluidics Station 450, GeneChip hybridization Oven 640).
17. HiSeq® 2500 Sequencing System.

5.2.4 Programas computacionales

- Microsoft Excel 2016. Licencia UANL.
- Expression Console Software. (Affymetrix, Santa Clara, CA). Life Technologies | Carlsbad, CA 92008 USA.
- Transcriptome Analysis Console (TAC) v.4.0. Life Technologies | Carlsbad, CA 92008 USA.
- Paquete R. Free Software Foundation's GNU General Public License.
- Basespace Illumina. Illumina, Inc.
- GraphPad 6 Software. GraphPad Software Inc.
- GraphPad 7 Software. GraphPad Software Inc.
- BISMARK v.0.17. Babraham Bioinformatics (Babraham Institute).
- TRIM GALORE! V.0.4.3. Babraham Bioinformatics (Babraham Institute).
- UCSC: Genome Browser. UCSC Genomics Institute.

- PANTHER™ Version 12.0 (2017-07-10). National Human Genome Research Institute and the National Science Foundation, and maintained by the Thomas lab at the University of Southern California.
- STRING v10.0. © STRING CONSORTIUM 2017.
- Affymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC).
- Mendeley Desktop versión 1.5.2.
- GeneCards (<http://www.genecards.org>).

5.3 MÉTODOS (ver anexos)

5.3.1 Lugar donde se realizó el estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio de Biología Estructural del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL, en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS-UANL) y en la Unidad de Secuenciación del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV en Irapuato, Guanajuato.

5.3.2 Análisis del ARN para microarreglos de expresión

5.3.2.1 Naturaleza de la muestra

La muestra de trabajo fueron biopsias de cuero cabelludo recolectadas en crioviales tubos Corning de 1.2 mL con RNAlater como conservador y estabilizador. Se tomaron aproximadamente 4 mm de biopsia por punción en estas condiciones de cada región estudiada. Una muestra de la región afectada y una de la región occipital o autocontrol de cada participante en el estudio. La muestra se homogenizó por inversión y posteriormente se almacenaron a 4°C por 24 horas para obtener una completa

impregnación del estabilizador y después se centrifugo para eliminar el exceso y almacenar la muestra a -80°C hasta su uso.

5.3.2.2 Extracción de ARN

Previo a la extracción de ARN las áreas a trabajar se limpiaron con ExoSAP IT-USB. La extracción de ARN se realizó utilizando 2 mm de biopsia. Para este propósito las muestras de tejido fueron homogenizadas con buffer RLT en el equipo Tissue Lyser II a 20Hz por 2 minutos y posteriormente incubadas a 55°C por 10 minutos con solución de proteinasa K en thermomixer. La extracción de ARN se llevó a cabo con el kit RNeasy Blood and Tissue Kit de QIAGEN, para lo cual el tubo con la muestra digerida se centrifugo y se separó el sobrenadante en un nuevo tubo al cual se le agregó etanol 96% para limpiar el lisado. Posteriormente se depositó la muestra en una columna con tubo colector, se centrifugó y se descartó el filtrado. Los buffers RW1 y RW2 fueron utilizados para purificar el material genético. La elución del ARN se llevó a cabo con 50 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C en 4 microtubos, 3 tubos con alícuotas de 10µL y un stock de 20 µL (Anexo1).

5.3.2.3 Cuantificación espectrofotométrica del ARN

La cuantificación preliminar de ARN se llevó a cabo en el equipo NanoDrop 8000, el cual es un espectrofotómetro UV-Vis de micro-volumen en el cual se pueden cuantificar múltiples muestras en menos tiempo con la misma fiabilidad. En este equipo se evaluó la cantidad, así como la relación 260/280 y 260/230. Las muestras de buena calidad tendrán una relación superior a 1.6 y una relación igual a 2 indica que el RNA presenta alta pureza.

5.3.2.4 Cuantificación de ARN utilizando el kit QuantiTTM RiboGreen Assay (Invitrogen).

La cuantificación por fluorometría se llevó a cabo con el reactivo RiboGreen en el equipo QUBIT. Para la cuantificación con Ribogreen primero se construye una curva de calibración con estándares de concentración conocida a partir del stock que provee el kit. Se preparará una solución de trabajo diluyendo el reactivo Quant-itTM 1:200 en el buffer Quant-iTTM. 200µl de solución de trabajo por cada muestra y para cada estándar fueron requeridos.

5.3.2.5 Evaluación de integridad del ARN

La calidad del ARN fue evaluada utilizando ExperionTMRNA StdSen por electroforesis capilar en el equipo Experion (BIORAD). Los ensayos de ExperionTMRNA StdSen se utilizan para determinar la integridad total del ARN y del ARNm, la pureza y concentración. El electroferograma que se genera permite la evaluación del ARN para detectar tanto la degradación, así como la presencia de ácidos nucleicos copurificantes, tales como ADN genómico y RNAt. Los datos de análisis que arroja la plataforma de Experion de una muestra de ARN total incluyen nombre del pico o del fragmento, tiempo de migración, área, porcentaje del área total, concentración, relación 28S: 18S y el indicador de calidad de RNA (RQI). El indicador de calidad de RNA (RQI por sus siglas en inglés) permite calcular el nivel de degradación en una muestra de ARN total. El algoritmo RQI compara el electroferograma de ARN de las muestras con el de una serie de muestras estandarizadas y degradadas. Los datos son normalizados y se regresa automáticamente un número entre 10 (ARN intacto) y 1 (ARN degradado) para cada muestra. Un valor entre 7-10 indica calidad óptima, 4-6

calidad posiblemente aceptable y 1-3 calidad no aceptable (Nota técnica del Manual Experion).

5.3.3 Microarreglos de Expresión

A partir de 250 ng se procedió a la preparación y marcaje de la muestra utilizando la plataforma de Affymetrix y los chips de microarreglos HG-U133 Plus 2.0. Este chip analiza el nivel de expresión de más de 47.000 transcritos y variantes, incluyendo 38.500 genes humanos bien caracterizados. Contiene más de 54.000 conjuntos de sondas y 1.300.000 oligonucleótidos distintos y presentan mayor precisión y reproducibilidad que cualquier otra plataforma de microarreglos.

5.3.3.1 Controles poli-A

El primer paso del protocolo implica hacer una mezcla de los 250 ng de ARN con los controles de hibridación poli-A que provee el kit. Estos controles poli-A supervisan el proceso completo del ensayo y nos permiten evaluar la sensibilidad, coherencia y rango dinámico del mismo. Estos controles de hibridación consisten en cuatro controles procariotas poliadenilados (lys, Phe, thr y dap) exógenos, premezclados.

5.3.3.2 Síntesis de la primera cadena

Este paso consiste en una reacción de retrotranscripción para obtener el DNA complementario (DNAc). Se mezclaron en vortex los 5µl del paso anterior (RNA + Controles Poli-A) con 4µl de First-Strand Buffer Mix y 1µl de First-Strand Enzyme Mix. Posteriormente se incubaron por 2 horas a 42 °C en un termociclador utilizando el programa “First-Strand cDNA Synthesis”, colocando en hielo posterior a este paso.

5.3.3.3 Síntesis de la segunda cadena

Se preparó un segundo master mix agregando: 13µl de agua libre de nucleasas, 5µl de Second-Strand Buffer Mix y 2µl de Second-Strand Enzyme Mix, se mezclaron en vortex y se les dio un spin para posteriormente colocarlos en hielo. Estos 20µl se mezclaron con los 10µl obtenidos de las síntesis de la primera cadena (paso anterior) y se incubaron por 1 hora a 60°C seguidos de 10min a 65°C utilizando el programa “Second-Strand cDNA Synthesis”.

5.3.3.4 Reacción de transcripción in vitro para obtener copias de RNA marcado con Biotina. IVT de las siglas en inglés transcripción in vitro.

Para este paso se preparó el IVT Master Mix con 4µl de IVTBiotin Label, 20µl de IVT Labeling Buffer y 6µl de IVT Enzyme Mix, se mezclaron en vortex y se les dio un spin. El IVT Master Mix fue transferido al tubo que contiene los 30µl de la reacción anterior, se mezclaron en vortex y se centrifugaron por 5 segundos. La reacción de IVT fue incubada a 40°C por 16 horas en un termociclador. Al término de la incubación se almacenó a -20°C.

5.3.3.5 Purificación del cRNA marcado

Posterior a la síntesis el RNA fue purificado con el fin de remover enzimas, sales y nucleótidos que no fueron incorporados durante la reacción. La purificación se llevó a cabo mezclando los 60 µL de cRNA marcado con 100 µL de las perlas magnéticas se mezcló pipeteando arriba y abajo 10 veces, y se transfirieron a un pozo de una placa de fondo en U donde se incubó durante 10 min, en este paso el cRNA se une a las perlas de purificación. La placa se coloca en un soporte magnético para capturar las perlas de purificación durante ~ 5 min, en este paso la mezcla es transparente, y las

perlas forman pellets contra los imanes. Una vez que se capturaron las perlas se desechó el sobrenadante sin perturbar las perlas de purificación, las cuales después fueron lavadas con 200 μ L de etanol 80% a cada pozo aún en el soporte magnético y se incubó durante 30 segundos, el etanol al 80% fue descartado desechando el etanol sin perturbar las perlas de purificación, este mismo paso se realizó 3 veces y se aseguró de eliminar completamente el etanol 80%. Posterior a esto se dejó secar al aire en el soporte magnético durante 5 minutos hasta que no se observó líquido y el pellet aparece brillante. Para finalizar se retiró la placa del soporte magnético y se añadió a cada muestra 27 μ L de agua precalentada (65 °C) y se incubó durante 1 min, se colocó la placa al soporte magnético por ~ 5 min para capturar las perlas de purificación y se transfirió el sobrenadante, que contiene el cRNA eluido, a un tubo libre de nucleasas. Las muestras purificadas de cRNA se colocaron a -20 ° C para su almacenamiento. La cantidad de cRNA marcado requerido para fragmentación para un formato 49 de microarreglos es de 15 μ g (en 1 a 32 μ L), y las muestras con concentraciones de cRNA superior a 3,000 ng / μ L se deben diluir.

5.3.3.6 Fragmentación de cRNA marcado

Para la fragmentación se utilizaron 15 μ g de cRNA (1-32 μ l), 8 μ l de 5x Array Fragmentation Buffer y Agua libre de nucleasas para completar un volumen total 40 μ l. La reacción se llevó a cabo incubando a 94°C por 35 minutos. Posterior a esto se evaluó la integridad del cRNA por electroforesis capilar para asegurarnos que se obtuvieran fragmentos menores a 120 pb y se almacenó a -20°C.

5.3.3.7 Hibridación de microarreglos

Se preparó el mix de Hibridación agregando 12.5 μ g de cRNA fragmentado, 4.2 μ L de Control Oligonucleotide B2 (3nM), 12.5 μ l de 20X Hybridization Controls, 125 μ L

de 2X Hybridization Mix, 25 μ L de DMSO y 50 μ L de agua libre de nucleasas y se calentó a 99°C por 5 minutos en un termociclador. Con 200 μ l de Pre-Hybridization Mix se cargó el chip (microarreglo) y se incubó a 45 °C por 10 minutos en el horno de hibridación. Posterior a esto, se removieron del chip los 200 μ l del Pre Hybridization Mix y se cargó con 250 μ l de la mezcla de Hibridación precalentado, durante la incubación del chip, la incubación se llevó a cabo a 45°C por 16 horas en el horno de hibridación de la plataforma Affymetrix.

5.3.3.8 Lavado y tinción de microarreglos

Después de las 16 horas de hibridación, se removió el microarreglo del horno, se descargó el coctel de hibridación del microarreglo y se transfirió a un microtubo nuevo para guardarlo a -80°C a largo plazo. Se cargó completamente cada microarreglo con aproximadamente 270 μ L de Array Holding Buffer, se esperó a que el microarreglo alcanzara la temperatura ambiente antes de lavarlo y teñirlo. Se colocaron los viales en la estación de fluidos de la siguiente manera: Un vial (cubierto con aluminio) con 600 μ l de Stain Cocktail 1 en el porta muestras 1, un vial (transparente) con 600 μ l de Stain Cocktail 2 en el porta muestras 2 y un vial (transparente) con 800 μ l de Array Holding Buffer en el porta muestras 3. Se inició el programa de lavado y tinción en la estación de fluidos utilizando el programa FS450_0001. Al finalizar este paso se procedió a escanear el chip.

5.3.3.9 Escaneo del microarreglo

Al finalizar el programa de lavado, se verificó que no quedaran burbujas en el chip y de ser así se colocaron sellos a los septos traseros, se limpió la superficie del mismo asegurándonos no quedaran restos de materia orgánica o polvo y posteriormente se procedió a escanear el chip.

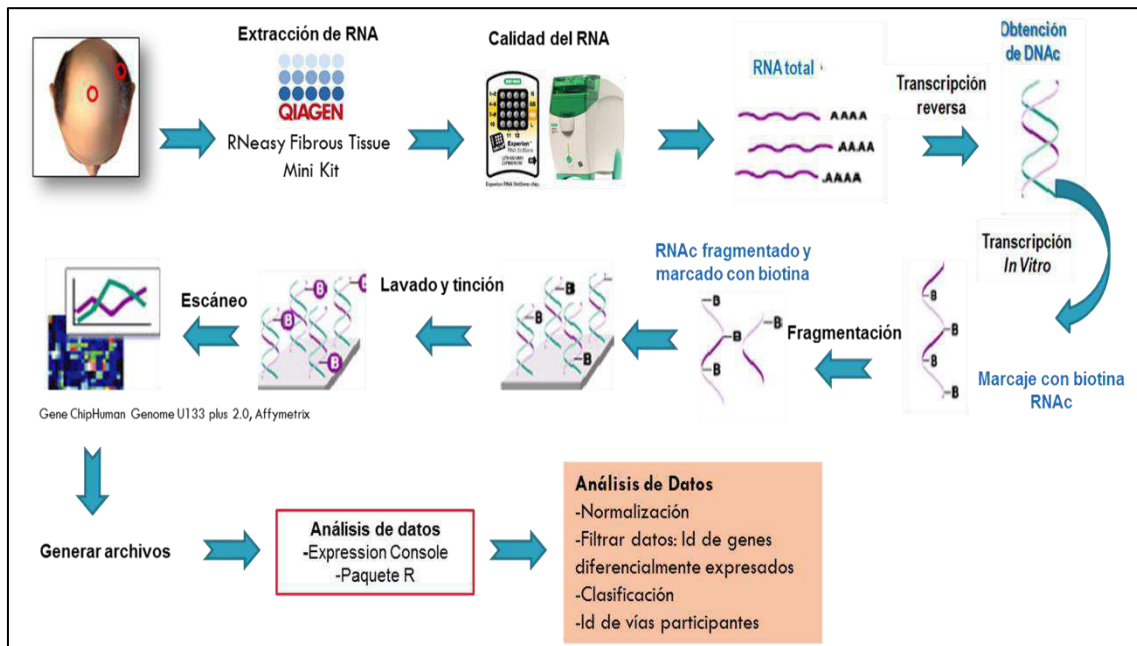


Figura 7. Procedimiento general para análisis de expresión con microarreglos Affymetrix.

5.3.4 Control de calidad del escaneo en plataforma Affymetrix

Utilizando el software Expression Console se llevó a cabo la evaluación de la calidad de las corridas a partir del archivo.CEL. La corrida con un porcentaje de 85-100% se considera de buena calidad, sin embargo, en este trabajo se tomó como punto mínimo de calidad un valor de QC del 90% debido a estándares de calidad propios del laboratorio de la Unidad de Genómica.

5.3.5 Identificación de genes diferencialmente expresados.

Los datos crudos del archivo. CEL de los microarreglos de expresión se normalizaron mediante RMA y la normalización cuantil con el paquete R (Irizarry et al., 2003). Se aplicó una prueba t pareada para detectar perfiles de expresión génica que fueran relativamente más altos o más bajos. Dado que las diferencias observadas fueron sutiles, se seleccionaron los genes cuyo valor de P fue inferior a 10^{-3} .

5.3.6 Identificación de las vías de señalización en las que participan los GDE.

Las listas de genes diferencialmente expresados se dividieron en sobre-expresados y sub-expresados para identificar las vías ya sea sobre-reguladas o sub-reguladas. Cada lista se sometió en el programa computacional PANTHER™ Versión 12.0, con el cual es posible identificar el tipo de proteínas para las que codifican los genes de interés, así como la función molecular y las vías de señalización alteradas. Se obtuvieron archivos de Excel con los datos de las vías para cada lista de genes, así como capturas de pantalla de las gráficas arrojadas.

5.3.7 Análisis de metilación por secuenciación Masiva

5.3.7.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por medio del kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) y el kit Isolate II Genomic DNA- Bioline como se muestra en el anexo 2. Para este propósito, las muestras de tejido fueron lisadas con buffer de lisis y proteinasa K, liberando el contenido citoplasmático y resultando una mezcla compuesta de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Se precipitaron las proteínas y posteriormente se centrifugaron para obtener una capa sólida de proteínas. Se recuperó posteriormente la fase acuosa que contiene el ADN. Finalmente se obtuvo el material genético mediante precipitación con isopropanol. Para eliminar el exceso de sales del ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en la solución de hidratación de ADN del kit comercial.

Extracción de ADN con kit Isolate II Genomic DNA- Bioline

1. Se cortaron 25 mg del tejido (biopsia de cuero cabelludo) y se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.

2. Pre-lisis: se agregaron 180 μ L de buffer de lisis GL y 25 μ L de solución de proteinasa K, se cubrió completamente la muestra con la solución y se dió vórtex.
3. Se incubó de 1 a 3 horas a 56 °C hasta obtener lisis completa del tejido.
4. Lisis: se dio vórtex a la muestra y se agregaron 200 μ L de buffer de lisis G3. Se dio vórtex vigorosamente y se incubó a 70 C por 10 minutos.
5. Ajustar condiciones para la unión del ADN: se dio vórtex breve y se agregaron 210 μ L de etanol 100% a la muestra.
6. Unión del ADN: cada muestra se colocó en una Spin Columna con tubo colector. Se agregó toda la muestra a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 11 000 xg. Se descartó el flujo y se reusó el tubo colector. Se repitió la centrifugación con las mismas condiciones.
7. Lavado de membrana de silica: se agregaron 500 μ L de Wash Buffer GW1. Se centrifugó por 1 minuto a 11 000 xg. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se reutilizó el tubo colector. Se agregaron 600 μ L de Wash Buffer GW2 a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 11 000 xg. Se descarto el sobrenadante y se reutilizó el tubo colector.
8. Secar la membrana de silica: Centrifugar por 1 minuto a 11 000 xg para remover el etanol. Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrifuga.
9. Elución del ADN: Agregar 100 μ L de Buffer de elución o agua grado biología molecular a 70°C directamente a la membrana de la columna e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 11000 xg.
10. Retirar la columna, cerrar el tubo y almacenar a -20°C.

5.3.7.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN

Electroforesis en gel de Agarosa

Se verificó la calidad de la extracción de ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% con una alícuota de 4 μ L de ADN y 1 μ L de jugo azul. Las muestras se corrieron a 80 Volts durante 40 minutos. Posteriormente se llevó el gel a tinción con bromuro de etidio durante 10 minutos. Para visualizar el ADN se llevó el gel teñido al fotodocumentador Gel Doc 100 de Bio Rad (anexo 3).

Cuantificación de ADN por espectrofotometría

El ADN se cuantificó en el equipo Nanodrop (Thermo Scientific), utilizando una alícuota de 1.5 μ L de ADN. Se verificó la calidad por medio de la relación 260nm/280nm, 260nm/230nm y la medición a 330nm. Los ácidos nucleicos (ADN y RNA) presentan su máximo de absorbancia a λ 260nm y las proteínas lo presentan a λ 280nm. La relación de absorbancias a estas longitudes de onda (260nm/280nm) se ha utilizado como una medida de la pureza tanto de ADN como de proteínas.

Cuantificación de ADN utilizando el kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay (Invitrogen).

La cuantificación por fluorometría se llevó a cabo con el reactivo PicoGreen en el equipo QUBIT. Para la cuantificación con PicoGreen primero se construye una curva de calibración con estándares de concentración conocida a partir del stock que provee el kit. Se preparó una solución de trabajo diluyendo el reactivo Quant-itTTM 1:200 en el buffer Quant-itTTM. 200 μ l de solución de trabajo por cada muestra y para cada estándar fueron requeridos.

5.3.7.3 Preparación de librerías para secuenciación

A partir de 3 µg de ADN se implementó y estandarizó el protocolo de preparación de librería con el kit SureSelect Methyl-Seq Target Enrichment System en LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato, Gto. Para iniciar 3 µg de DNA fueron fragmentados en el ultrasonicador Covaris S220 para obtener fragmentos de 150-200pb. El ultrasonicador Covaris S220 funciona suministrando energía acústica altamente controlada y enfocada a las muestras generando fragmentación del ADN. La preparación de la librería se llevó a cabo con kit SureSelectXT Metil-Seq (Agilent). Este kit está diseñado para secuenciar hasta 84Mb que cubren 3,7 millones de sitios CpG los cuales incluyen: islas CpG, DMRs específicos de tejido, promotores Gencode, DMRs con función reguladora y todos los genes Refseq. Para iniciar la preparación de la librería se partió de los fragmentos de 150-200 pb los cuales fueron reparados, purificados con perlas AMPure XP y analizados con Bioanalyzer 2100 y ensayo de DNA 1000. Posteriormente se realizó la adenilación del extremo 3' de los fragmentos de ADN, ligación del adaptador metilado y purificación del DNA ligado al adaptador utilizando perlas AMPure XP y nuevamente se llevó a cabo la evaluación de calidad y cantidad usando el ensayo DNA 1000 en Bioanalyzer 2100. La captura de híbridos se llevó a cabo utilizando perlas de estreptavidina. El DNA se modificó mediante conversión con bisulfito utilizando EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZYMO RESEARCH). El fundamento del uso del bisulfito de sodio se basa en que este reactivo actúa desaminando las citosinas del DNA convirtiendo estas en uracilo, mientras que por sus propiedades físico-químicas es incapaz de actuar sobre las citosinas que se encuentren metiladas, que son conocidas como 5-metilcitosinas. Posteriormente se realizó amplificación por PCR de las bibliotecas tratadas con bisulfito. Las bibliotecas modificadas mediante amplificación por PCR se indexaron y purificaron. Se preparó

un pool de bibliotecas indexadas para llevar a secuenciación. El ensayo de la metilación se llevó un cabo en HiSeq2500 utilizando 300 ciclos en formato de 2x150 de modo rápido. Se realizó el análisis de calidad de las secuencias y un análisis rápido con UCSC-Genome Browser-BISMARK.

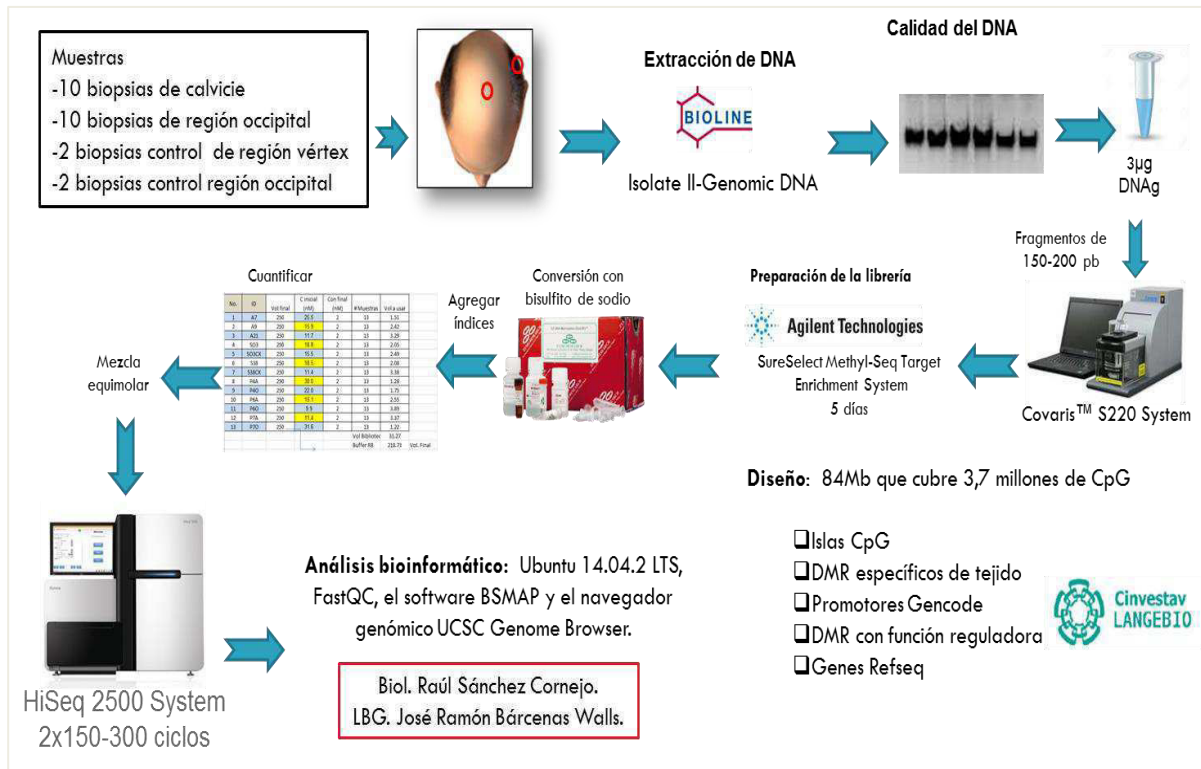


Figura 8. Metodología general para análisis de metilación por secuenciación masiva.

5.4 Validación de los resultados de expresión por Q-PCR

A partir de 200 ng de ARN se llevó a cabo la obtención de cDNA por retrotranscripción utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Thermo Fisher Scientific Inc. Posterior a esto se llevó a cabo la obtención de la eficiencia y estabilidad de los genes endógenos seleccionados para el ensayo de validación de microarreglos de expresión de los genes *WNT3* y *HSD17B6*. Con el cDNA obtenido, se realizaron diluciones seriadas en órdenes de magnitud 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000, en un volumen total de 20 µl. Se utilizaron 4 sondas Taqman marcadas con FAM, para los genes: *WNT3*, *HSD17B6*, *MTMR3* y *AK3* (TaqMan™ Probes, Thermo Fisher Scientific Inc, PN: 4351370). Utilizando las proporciones descritas se realizaron triplicados en placas de 96 pozos con un volumen final de reacción de 10 µl utilizando el Light Cycler 480 de Roche. Las condiciones del ensayo se describen en anexos.

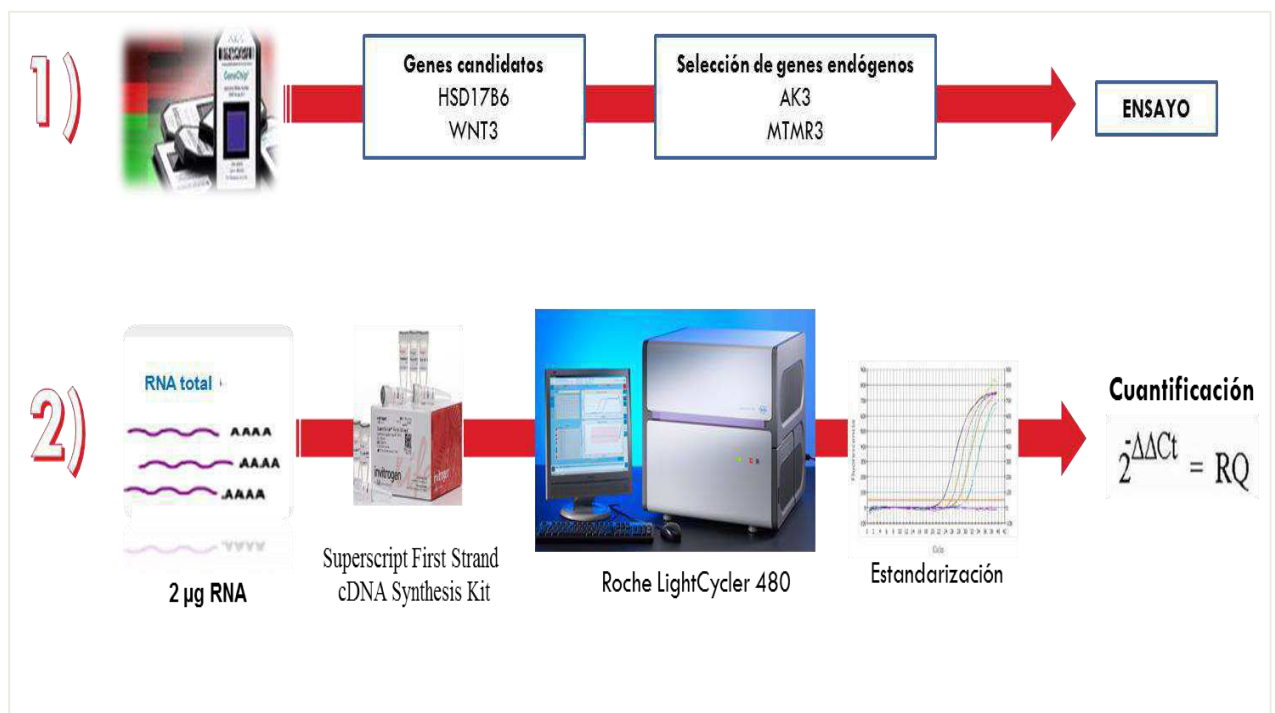


Figura 9. Metodología general para el análisis de expresión de los genes *HSD17B6* y *WNT3* en PCR Tiempo Real.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1 Análisis demográfico

El proyecto fue sometido y aprobado por el comité de ética de la Sub-dirección de Investigación de la Facultad de Medicina-UANL con el registro BI14-001 en enero del 2014. Los sujetos incluidos en este proyecto de investigación leyeron y firmaron el consentimiento informado, llenaron un cuestionario de valoración de pacientes diseñado por este grupo de investigación. Posteriormente se tomaron 2 biopsias a cada sujeto por punch de 3-4 mm una de región afectada y otra de occipital, las cuales fueron correctamente etiquetadas y almacenadas hasta su uso a 4°C en solución de RNAlater.

Se captaron 16 pacientes con AAG de 22 a 52 años de edad los cuales fueron clasificados en etapa IIIA a la VA según la escala de Hamilton-Norwood (Figura 10). El 12.5% de los pacientes se clasificaron en la etapa moderada IIIA, mientras que 31.25% de los pacientes se encontraron en etapa IIIV. Las etapas IV, IVA y VA tuvieron una representación del 12.5% cada una. EL 18.75% se clasificó en etapa V. Como controles participaron 2 jóvenes voluntarios de 21 y 22 años sin AAG ni antecedentes familiares de la misma. La clasificación clínica fue determinada por el dermatólogo tratante. La escala Hamilton-Norwood es la más utilizada y aceptada para evaluar clínicamente a los pacientes con AAG, especialmente para los ensayos terapéuticos o para establecer su asociación con otras enfermedades importantes como la enfermedad isquémica del corazón y el cáncer de próstata, ya que permite de manera gráfica valorar el sitio y el grado de la afección.

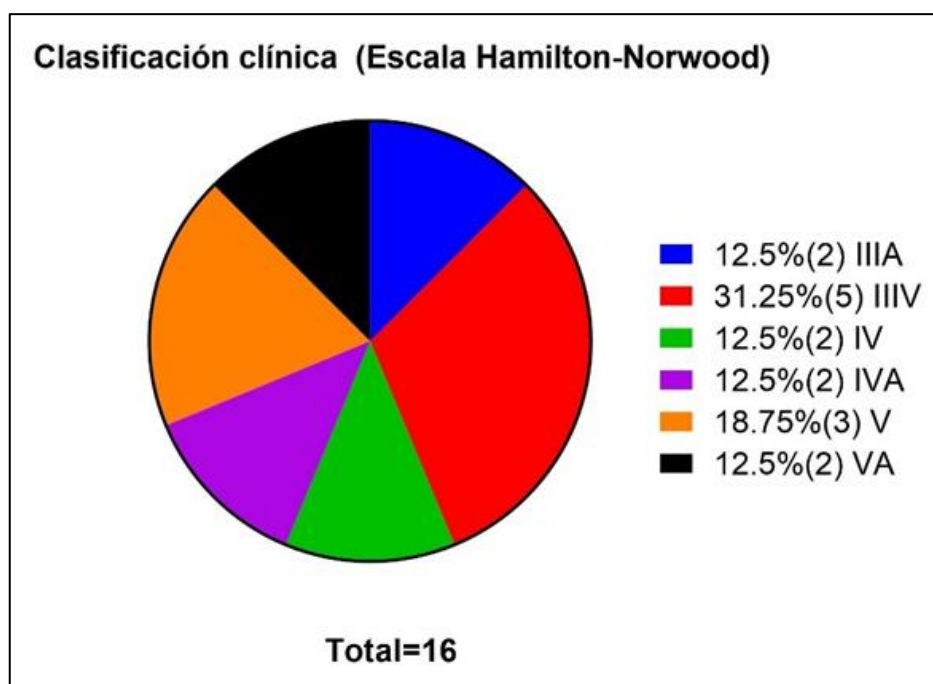


Figura 10. Clasificación clínica de los pacientes con AAG.

El rango de edad de inicio va de los 15 a los 36 años, descartando con esto que se incluyeran pacientes con alopecia por senescencia. La media de edad de los pacientes incluidos fue de 33.6875 años con una media de edad de inicio de 24.75 años. La procedencia de los participantes de este estudio es la siguiente: 16 de Nuevo León, 1 de Coahuila y 1 de Veracruz.

Tabla 3. Clasificación clínica, edad actual y edad de inicio de los pacientes.

Grado H-N	Rango de edad	Edad de inicio
IIIA	22-26	20-24
IIIV	24-28	21-25
IV	32-51	25-35
IVA	37	22-25
V	26-51	15-30
VA	45-52	30-36

Edad actual y edad de inicio de los pacientes de acuerdo a la clasificación clínica con la escala de Hamilton-Norwood.

En cuanto a los antecedentes familiares, el 31.25% de los pacientes contaba con antecedentes paternos, el 12.5% con antecedentes maternos, un 50% con antecedentes tanto paternos como maternos y un 6.25% sin antecedentes familiares de alopecia androgenética (Figura 11).

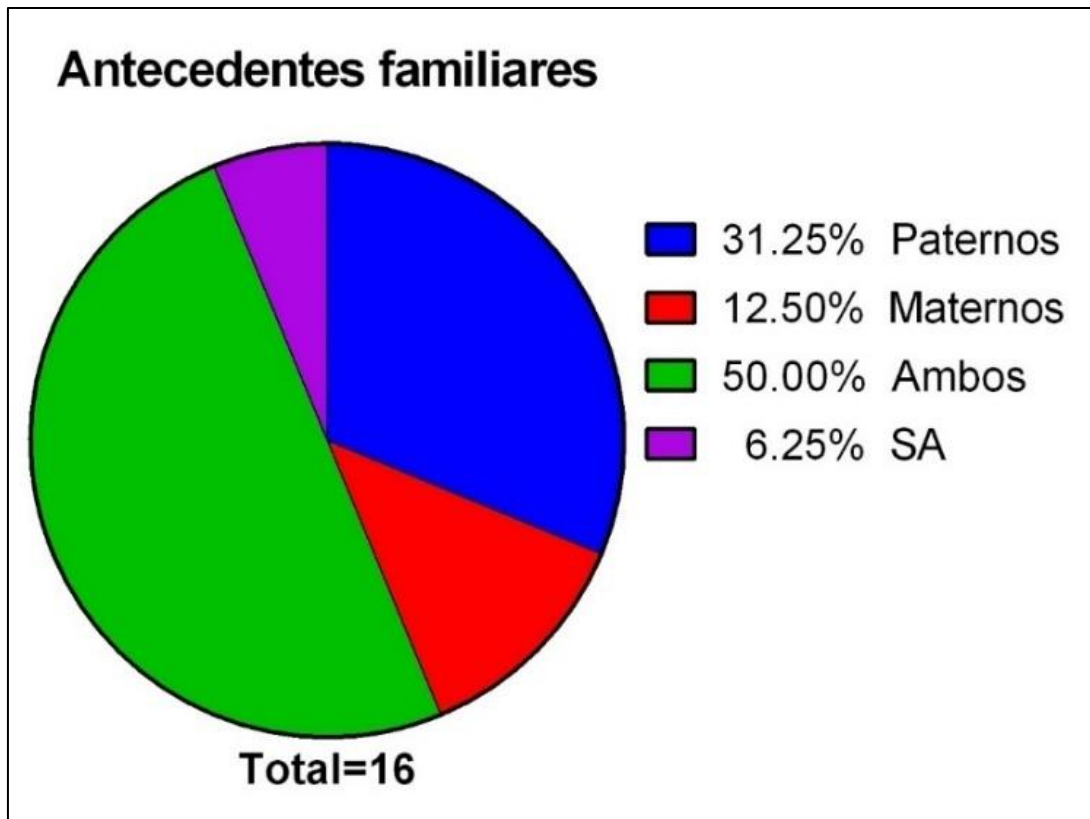


Figura 11. Antecedentes familiares de AAG.

Fue posible analizar el árbol genealógico de un grupo de 3 hermanos que presentaron AAG tipo IIIV a edad temprana (18 años) que muestra que los pacientes presentan antecedentes de AAG tanto paternos como maternos, lo cual podría influir una presentación prematura de AAG (Figura 12).

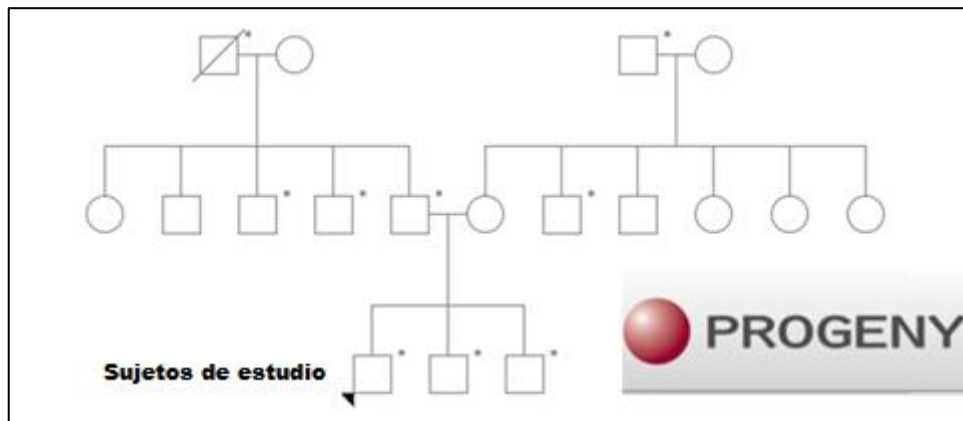


Figura 12. Árbol genealógico de 3 hermanos con AAG.

En cuadros se esquematiza a los hombres y en círculos a las mujeres. (*) Representa los sujetos afectados con AAG. PROGENY Software.

Se analizó la posible correlación entre la edad de los pacientes y el grado de afección, observando una correlación positiva, es decir conforme aumenta la edad del paciente aumenta el grado o etapa de afección de AAG (Figura 13).

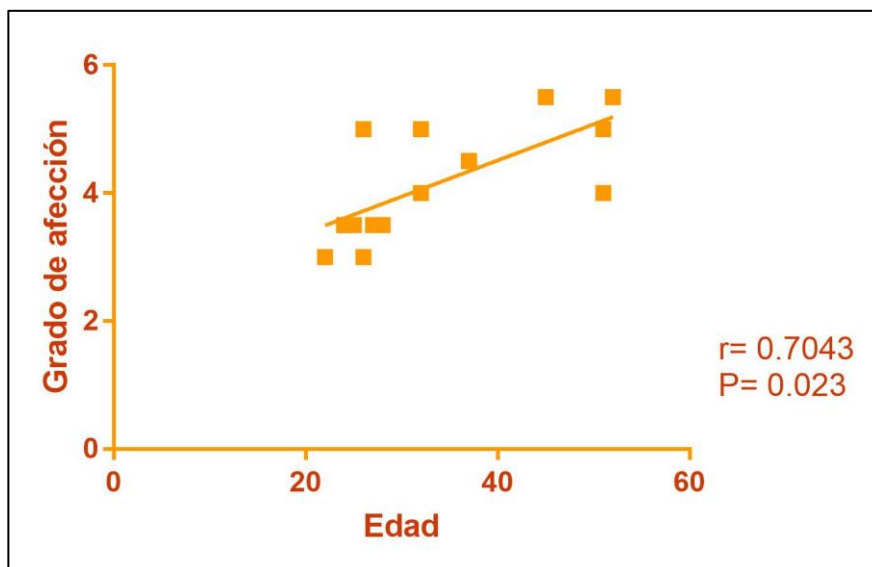


Figura 13. Correlación entre el grado de afección y la edad. Análisis de correlación de Pearson (GraphPad 7).

6.2 Evaluación de Calidad del RNA

Las muestras procesadas obtuvieron una concentración en un rango de 50-60 ng/ μ L de RNA y un valor de RQI (RNA quality indicator) mayor a 7.8. Por lo tanto, todas fueron aptas para trabajar en microarreglos (Tabla 4). Se evaluó también la calidad e integridad de los diferentes RNA ladder del laboratorio para seleccionar el mejor.

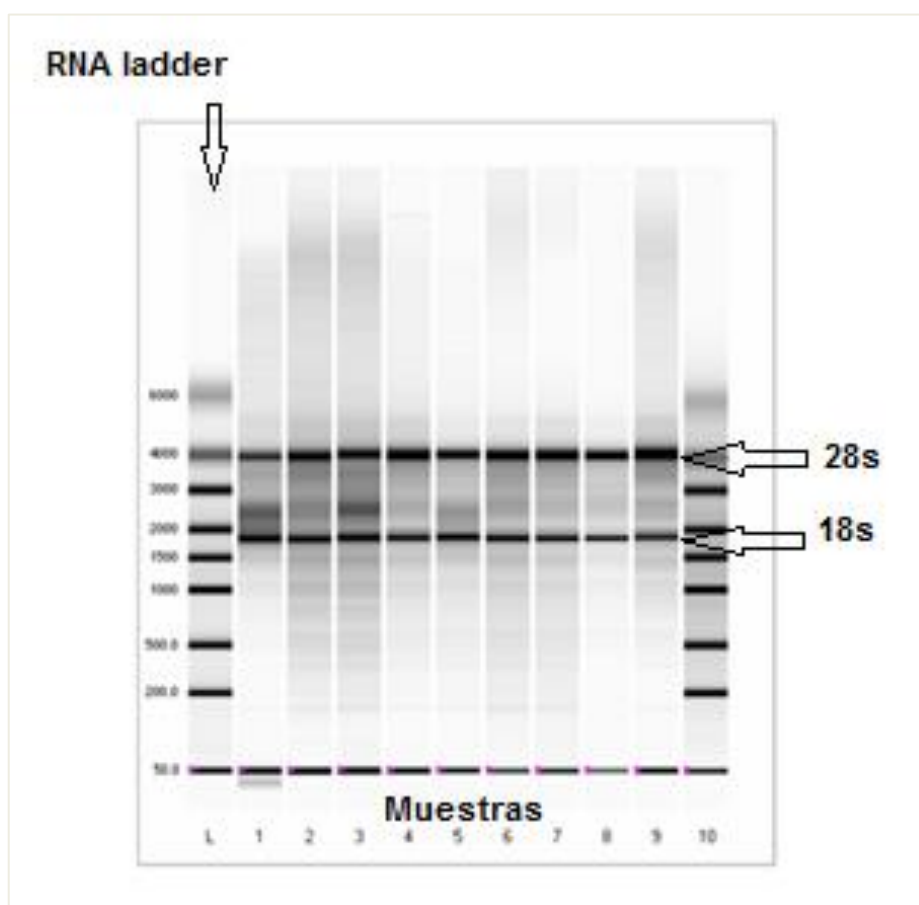


Figura 14. Electroforesis capilar de RNA total de biopsias de cuero cabelludo.

Se observan las 2 bandas correspondientes a las subunidades 28s y 18s del RNA. Del carril 1-9 corresponden a los primeros pacientes captados, el carril L y 10 corresponden al RNA Ladder. Se puede observar la excelente calidad de las 9 muestras seleccionadas para análisis de microarreglos de expresión.

Well ID	Sample Name	RNA Area	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification
L	Ladder	62.85			
1	Ladder Viejo 1	125.97	1.32	7.7	■
2	Ladder Viejo 2	32.28	1.29	10.0	■
5	1L	182.44	0.00	8.7	■
6	1L (Dup)	115.62	1.72	9.6	■
7	2L	213.39	0.85	7.8	■
8	2L (Dup)	105.15	1.43	9.4	■
9	3L	180.31	1.17	9.3	■
10	3L (Dup)	93.70	1.20	8.7	■
11	4L	320.94	1.40	9.5	■
12	4L (Dup)	205.90	1.35	9.1	■

Tabla 4. Valores de Calidad de Integridad de RNA(RQI).

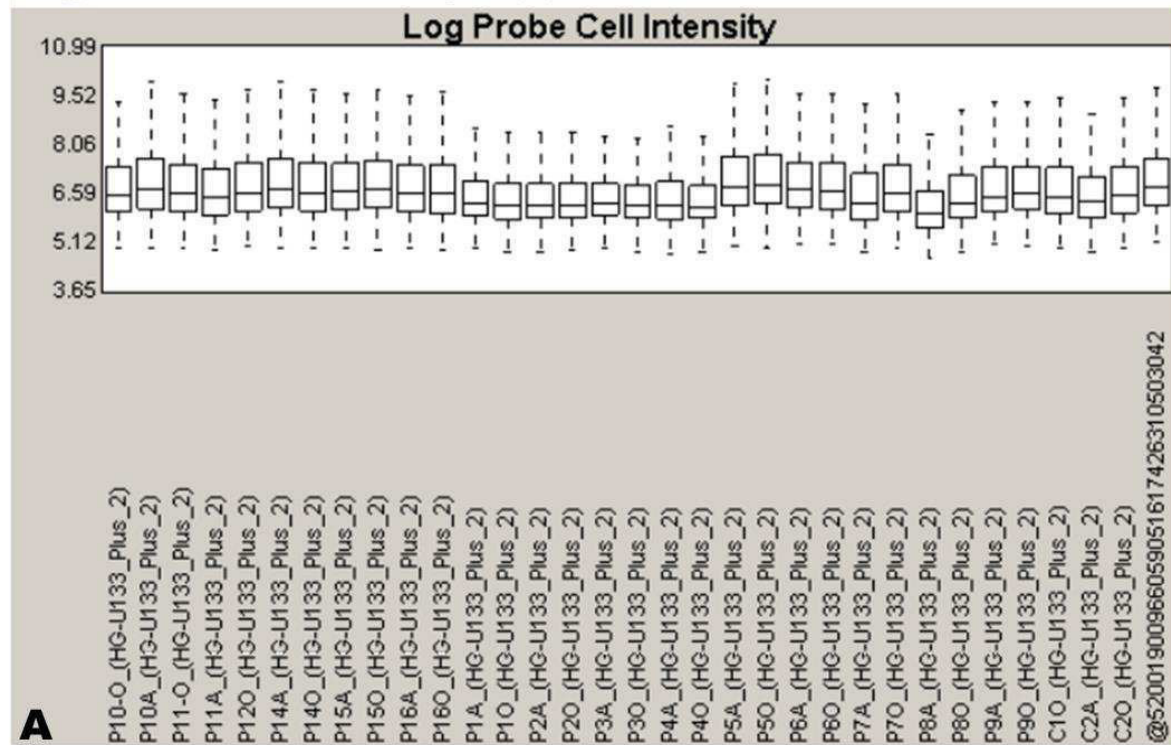
Carril 1-3 evaluación de los RNA ladder a utilizar. Carriles 5-12 corresponden a 4 muestras por duplicado todas con RQI igual o superior a 7.8 valor óptimo para trabajar con microarreglos.

6.1.2 Control de Calidad de microarreglos

Se corrieron 34 chips, 30 correspondientes a pacientes y 4 a controles. En el pre-procesamiento de calidad los arreglos mostraron una distribución similar en forma y posición con análisis de RMA (Robust Multiarray Average). El procesamiento mediante RMA implica un proceso en tres etapas:

1. Corrección de fondo (el RMA hace precisamente esto).
2. Normalización para hacer los valores de los arrays comparables.
3. Sumarización de las diversas sondas asociadas a cada grupo de sondas para dar un único valor.

Log Probe Cell Intensity - (3)



Relative Log Expression Signal - RMA - Group 1 - (6)

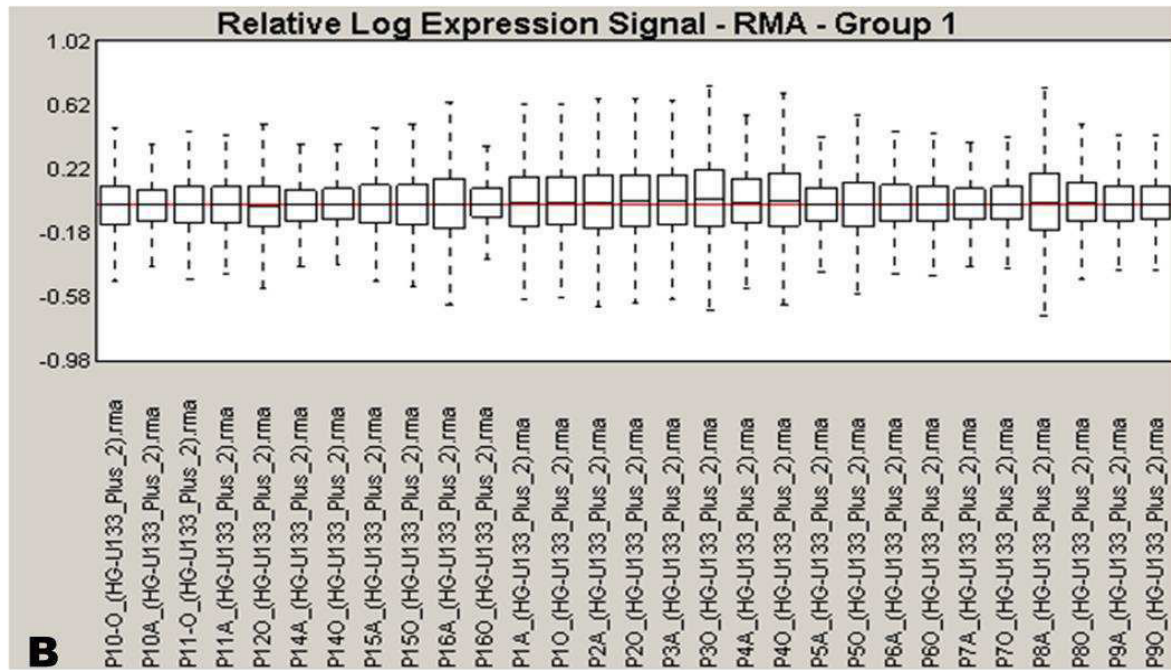


Figura 15. Distribución de datos después de aplicar el método RMA "Quantile Normalization". A) Box plot de los datos sin normalizar. B) Box plot de datos normalizados.

Posterior al RMA se procedió con la normalización global para demostrar que todas las muestras son comparables entre sí. En la figura 16 se observa una superposición de las curvas de datos de expresión de cada muestra, esto debido al efecto de la normalización, esta superposición es un indicador de que las muestras procesadas son comparables.

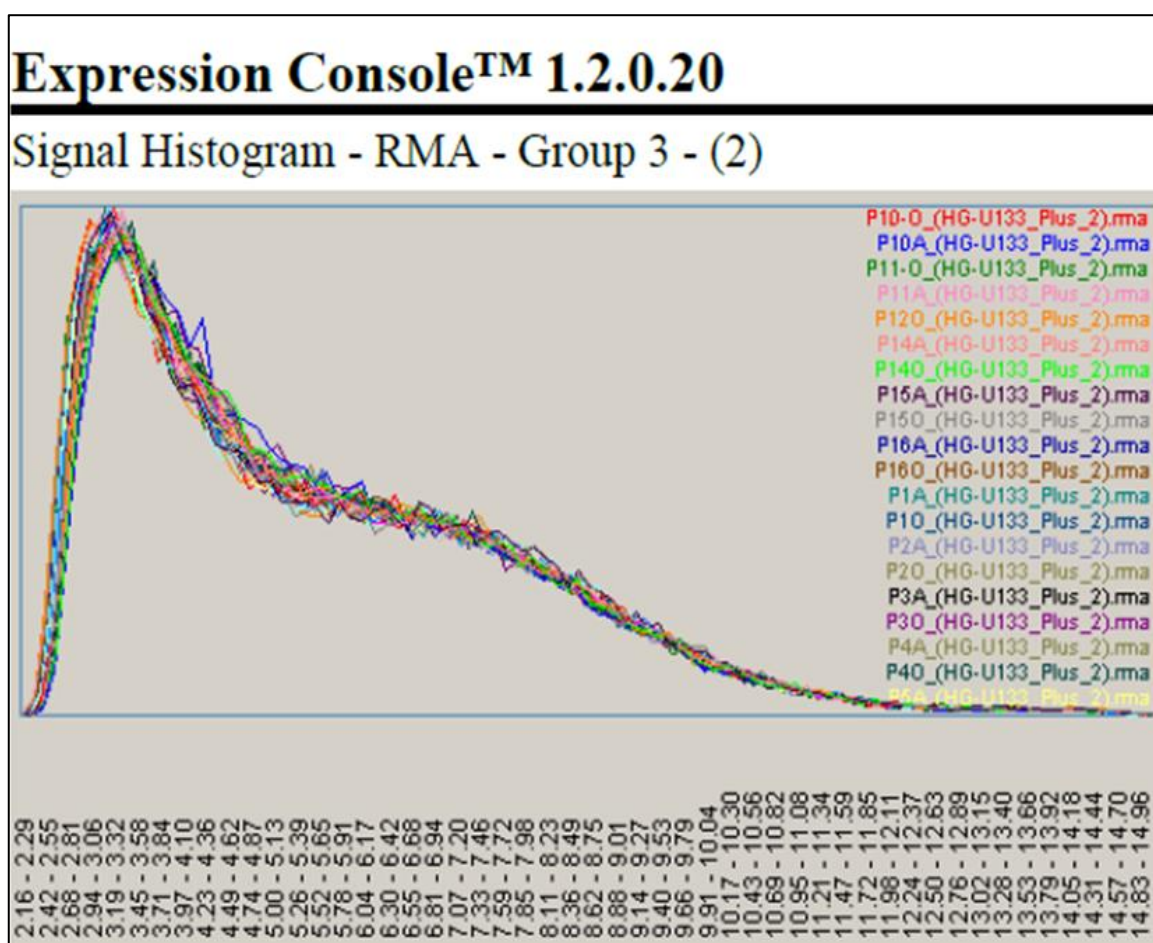


Figura 16. Histograma de la señal de los datos del RMA de microarreglos de expresión. Indica que las muestras son comparables.

Tanto el coeficiente de correlación de Pearson(r^2) como el de Spearman(r^2) son utilizados para evaluar la concordancia de la señal de datos de microarreglos, estos

coeficientes de correlación comparan los valores de señal en 2 archivos de tipo CHP en los cuales los valores r^2 son convertidos en una escala de pseudocolor (Figura 17).

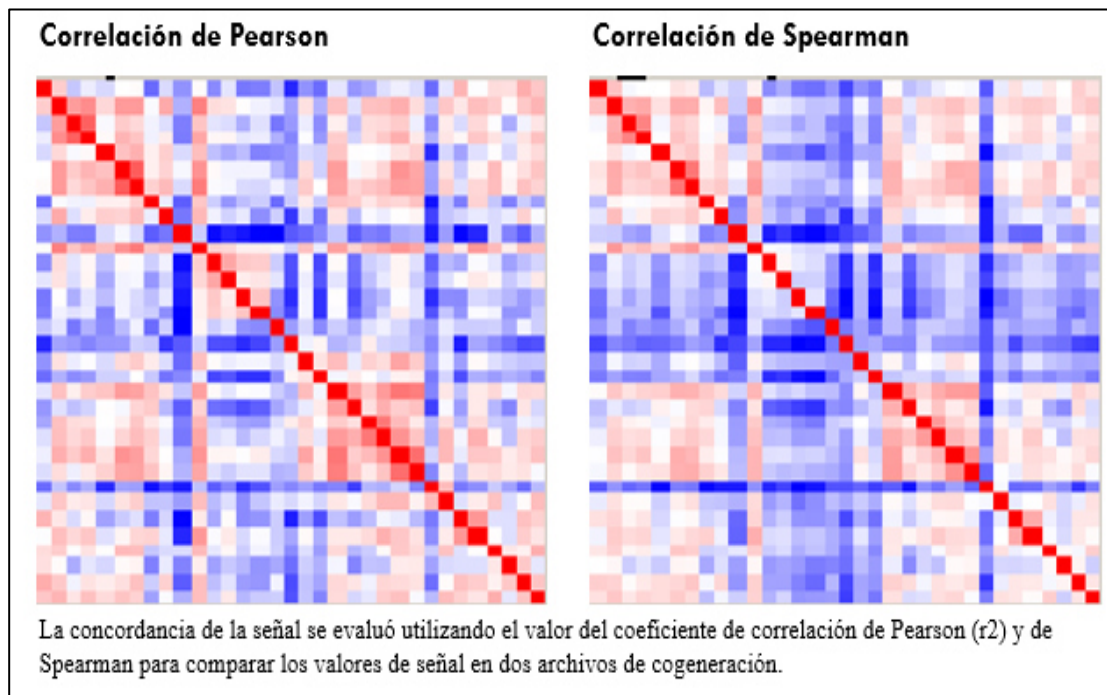


Figura 17. Mapa de calor de la correlación de Pearson y Spearman de los microarreglos de expresión.

6.1.3 Expresión diferencial por microarreglos

El análisis de expresión global permitió identificar 34 genes diferencialmente expresados ($P < 0.001$).

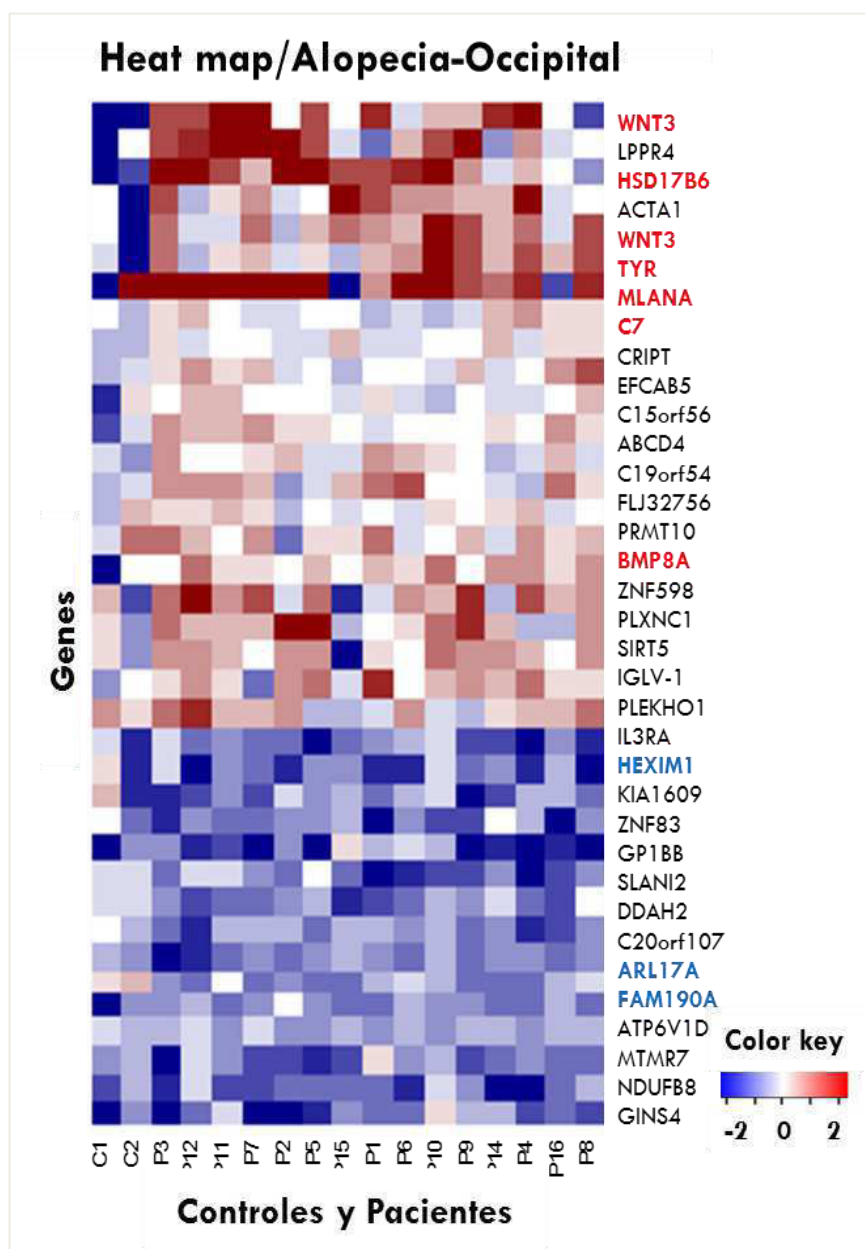


Figura 18. Mapa de calor del perfil de expresión de la región de calvicie vs la región occipital. Se observan GDE en rojo (sobre-expresados) y en azul (Sub-expresados) ($P < 0.001$).

Los genes diferencialmente expresados corresponden a: 21 genes sobreexpresados: entre los cuales se encuentran los genes de interés *C7*, *IL3RA*, *MLANA*, *TYR*, *WNT3*, *HSD17B6* y *BMP8A*. Dentro de los 13 genes subexpresados se encuentran *FAM190*, *HEXIM1* y *ARL17A* (Figura 18). Alta expresión de *MLANA* y *TYR* es un indicador de estrés oxidativo. Entre los genes sobre-expresados en la región de

calvicie se observaron *WNT3* y *HSD17B6* [hidroxiesteroide (17- β) deshidrogenasa 6]. *WNT3* se expresa en los folículos en desarrollo y maduros. La vía WNT/ β catenina es asociada a la miniaturización del folículo en AAG. Millar et al., (1999) determinó que la sobreexpresión de *WNT3* en ratones transgénicos induce un fenotipo de pelo corto. La enzima HSD17B6 convierte al androstenediol en DHT y es un gen clave en el metabolismo androgénico (Cela et al., 2003).

6.1.4 Análisis de Procesos biológicos y vías de señalización en AAG.

El 21% de los genes diferencialmente expresados están involucrados con procesos celulares como proliferación, comunicación y reconocimiento, 19.6% en procesos metabólicos, 10% en procesos del desarrollo, 8.9 en respuesta a estímulos y un 7% en el sistema inmune.

Las vías de señalización involucradas corresponden a la vía WNT, caderinas, presenilina-Alzheimer, inflamación mediada por quimiocinas, TGF- β y biosíntesis de hormonas esteroideas.

- Vía WNT. La señalización por la familia Wnt de glicolipoproteínas secretadas a través del co-activador de la transcripción β -catenina controla el desarrollo embrionario y la homeostasis del adulto (MacDonald et al., 2009).
- Señalización de caderinas. Las caderinas son una superfamilia de glucoproteínas transmembranales que intervienen en la adhesión célula-célula. Las clásicas incluyen la E-cadherina y N-cadherina. La expresión y función de la E-cadherina es esencial para muchos procesos durante el desarrollo embrionario, como la polarización celular y diferenciación epitelial. Por otro lado, se ha descubierto una importancia enorme en la tumorigénesis. La pérdida de la adhesión celular mediada por E-cadherina es un evento inicial de la

transición epitelio-mesénquima (TEM), la cual se correlaciona con un incremento de invasión y metástasis en diversos cánceres humanos (Günther & Pedernera-Astegiano., 2010)

- Presenilina-Alzheimer. Las presenilinas son una familia de proteínas transmembranales que constituyen la subunidad catalítica de la enzima gamma-secretasa, la cual presenta actividad de proteasa en las membranas celulares, tiene una estructura compleja y consta de varias subunidades. A la fecha, se han descrito dos presenilinas, la presenilina 1 o PSEN1 y la presenilina 2 o PSEN2. Existen diversas mutaciones que pueden afectar la estructura de las presenilinas y estas se han asociado con algunos casos de enfermedad de Alzheimer hereditaria de inicio precoz (Schellenberg GD et al., 1992).
- Señalización TGF- β . La unión de TGF- β a la superficie de la célula produce la activación de múltiples vías de transducción de señales que están conectados de manera compleja entre sí, y con otras redes de respuesta implicadas en la detección de entrada de información celular. Datos recientes indican que los cambios en la intensidad de la señal y la conectividad de estas vías pueden subyacer la transición compleja de la vía TGF- β de supresor de tumores a oncogén durante la tumorigénesis (Lalage M Wakefield & Anita B Roberts., 2002).
- Biosíntesis de hormonas esteroideas. La biosíntesis de las hormonas esteroideas es necesaria para mantener la función reproductiva y la homeostasis en general. Este proceso se lleva a cabo en tejidos esteroideogénicos regulados en forma aguda o crónica y activas vías de señalización mediadas particularmente por cinasas de proteínas dependientes del adenosín monofosfato cíclico/AMPC (PKA).

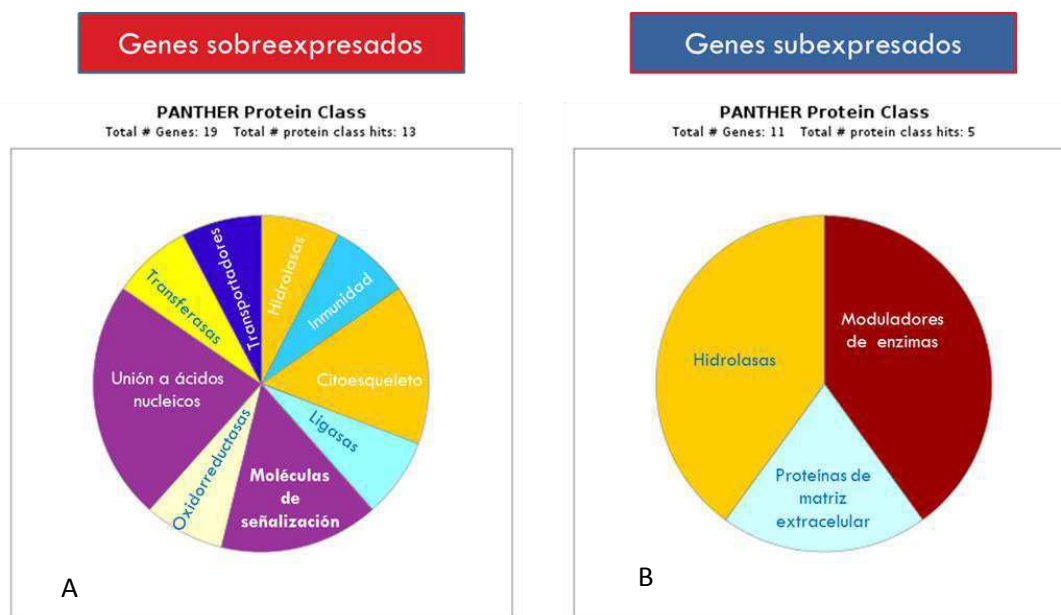


Figura 19. Análisis en PANTHER para identificar el tipo de proteína que codifican los GDE. A) Genes sobre-expresados. B) Genes sub-expresados.

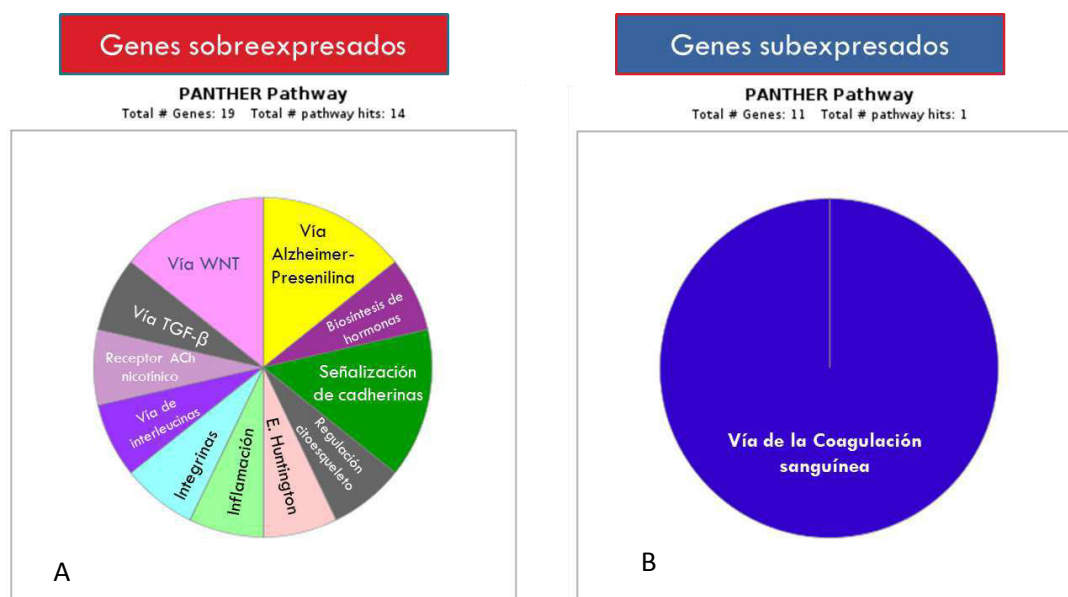


Figura 20. Análisis en PANTHER v12.0 para identificar las vías de señalización en las que participan los GDE. A) Genes sobre-expresados. B) Genes sub-expresados.

6.1.5 Análisis de interacción con STRING v10.0

Solo se observó interacción entre los genes MLANA y TYR, los cuales participan en la biogénesis del melanosoma proceso que está asociado a estrés oxidativo (Figura 21).

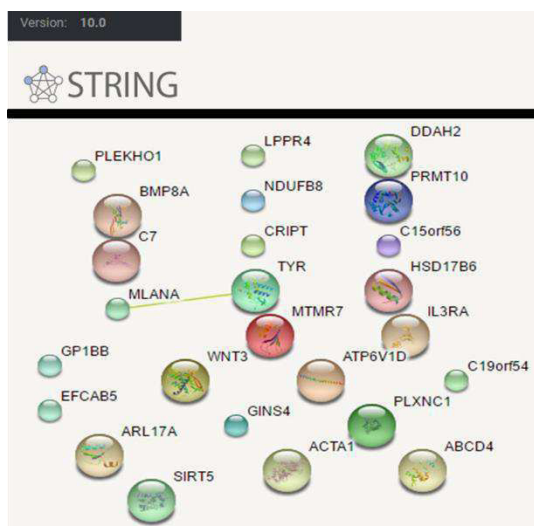


Figura 21. Mapa de interacción proteica de los GDE en región de calvicie vs sin calvicie. Solo se observó interacción entre los genes MLANA y TYR (línea verde).

6.1.5 Análisis de genes asociados con AGA en estudios previos.

Se identificaron 6 genes diferencialmente expresados asociados con AAG ($p < 0.05$) (ver Tabla 5), 3 de los cuales corresponden a un estudio de transcriptoma (2016) en el cual los genes están involucrados en procesos redox. *CYB5R4*, *INSR* y *SDHA1* participan en la cadena respiratoria.

PTGDS, recientemente reportada por Garza et al, también se encontró sobre-expresada en la región de calvicie lo que sugiere que junto con PGD2 produce la inhibición del crecimiento del pelo. GSN fue diferencialmente expresado a nivel de proteína, en el análisis funcional de este gen se ha demostrado que *GSN* potencia la actividad del receptor de andrógenos (AR) en presencia de otro andrógeno. Además, *GSN* está implicado en la remodelación de actina en crecimiento y en células apoptóticas,

escindidas por *CASP3* para formar un efecto potencial de cambio morfológico durante la apoptosis proceso involucrado también en alopecia.

Tabla 5. Genes asociados con AAG en diferentes estudios.

Gen	P.value	Autor
GSN	0.002399207	Moon et al 2013
PTGDS	0.017131072	Garza et al.2013; Chew et al 2016
MUC7	0.03943607	Mirmirani et al 2014
INSR	0.047640352	Chew et al 2016
SDHA1	0.047739872	Chew et al 2016
CYB5R4	0.047778174	Chew et al 2016
CYB5R3	0.077429658	Chew et al 2016
DUSP1	0.100719441	Chew et al 2016
SKP1	0.126589971	Moon et al. 2013
SDHAP2	0.133314252	Chew et al 2016
FOS	0.151186748	Mirmirani et al 2014
PAICS	0.172444679	Moon et al. 2013
IQGAP1	0.174594399	Moon et al. 2013
PSG3	0.182617486	Mirmirani et al 2014
BDNF	0.206027157	Panchaprateep et al. 2011
EDA2R	0.256283654	Prodi et al 2008
SRD5A1	0.326588026	Chew et al 2016
SLC6A14	0.342937577	Mirmirani et al 2014
SPTAN1	0.355263643	Moon et al. 2013
FOSB	0.366451353	Mirmirani et al 2014
CKAP4	0.383216847	Moon et al. 2013
CYR61	0.440015107	Mirmirani et al 2014
FADS2	0.505116941	Chew et al 2016
GPX4	0.52728053	Chew et al 2016
HBB	0.601236307	Mirmirani et al 2014
WNT10A	0.604961335	Heilman et al 2013
EFCAB4B	0.626420009	Mirmirani et al 2014
EGR1	0.658243975	Mirmirani et al 2014
PRX3	0.845802588	Chew et al 2016
GPR44	0.897160888	Garza et al.2013
AR	0.922041631	Richeti et al 2013
PLEC1	0.977706286	Moon et al. 2013

En esta tabla se presentan los genes asociados con alopecia androgenética en diferentes estudios de expresión y de GWAS. El valor de P de la tabla es obtenido del resultado del presente trabajo. En Rojo se observan los genes con expresión diferencial estadísticamente significativa a un valor de $P < 0.05$.

Tabla 6. Lista de genes diferencialmente expresados entre la región de calvicie y la región occipital de los pacientes con AAG.

Gen	Función
WNT3	Ligando para miembros de la familia frizzled de siete receptores transmembrana. Wnt-3 y Wnt-3a juegan papeles distintos en la señalización celular-celular durante la morfogénesis del tubo neural en desarrollo.
LPPR4	Hidroliza el ácido lisofosfatídico (LPA). Facilita el crecimiento axonal durante el desarrollo y germinación regenerativa.
HSD17B6	Tiene actividad 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa hacia diversos esteroides (in vitro). Convierte 5-alfa-androstano-3-alfa, 17-beta-diol a androsterona y estradiol a estrona (in vitro). Tiene actividad 3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa hacia la androsterona (in vitro).
ACTA1	Actina alfa que se encuentra en el músculo esquelético.
TYR	La enzima codificada por este gen cataliza los primeros 2 pasos, y al menos 1 etapa subsiguiente, en la conversión de tirosina en melanina.
MLANA	Involucrado en la biogénesis melanosoma garantizando la estabilidad de GPR143. Juega un papel vital en la expresión, la estabilidad, el tráfico y el procesamiento de la proteína melanocítica PMEL, que es fundamental para la formación de melanosomas en estadio II.
C7	Constituyente del complejo de ataque de membrana (MAC) que desempeña un papel clave en la respuesta inmune innata y adaptativa al formar poros en la membrana plasmática de las células diana. C7 sirve como ancla de membrana.
CRPT	Participación en el anclaje citoesquelético de DLG4 en las sinapsis excitatorias.
EFCAB5	Homo sapiens EF-mano calcio dominio 5 (EFCAB5), transcripción variante 2, mRNA.
C15orf56	Cromosoma 15 marco de lectura abierto 56.
ABCD4	La proteína codificada por este gen es un miembro de la superfamilia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC). Las proteínas ABC transportan varias moléculas a través de las membranas extra y intracelulares.
C19orf54	Cromosoma 19 marco de lectura abierto 54
FLJ32756	Homo sapiens cDNA FLJ32756 fis, clon TESTI2001758.
PRMT10	Proteína arginina metiltransferasa humana 10
BMP8A	Este gen codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta de las proteínas reguladoras. La preproteína codificada experimenta un procesamiento proteolítico para generar la proteína madura.
PLXNC1	
SIRT5	Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas sirtuin, homólogos a la levadura Sir2 proteína.
PLEKHO1	Homo sapiens homología dominio pleckstrina que contiene O1 (PLEKHO1).
IL3RA	La proteína codificada por este gen es una subunidad específica de interleucina 3 de un receptor heterodimérico de citoquina.
HEXLM1	Homo sapiens hexametilén bisacetamida inducible 1.
GP1BB	Glicoproteína 1B subunidad beta de Plaquetas.
SLAIN2	Homo sapiens SLAIN motivo miembro de la familia 2 (SLAIN2).

Gen	Función
DDAH2	Este gen codifica una dimetilarginina dimetilaminohidrolasa. La enzima codificada funciona en la generación de óxido nítrico mediante la regulación de las concentraciones celulares de metilargininas.
ARL17A	Factor de ribosilación de ADP de Homo sapiens como la GTPasa 17A (ARL17A).
ATP6V1D	Este gen codifica un componente de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), una enzima multi-subunitaria que media la acidificación de los organelos intracelulares eucarióticos.
MTMR7	Este gen codifica un miembro de la familia de las miotubularinas de tirosina / fosfatasas de doble especificidad.
NDUFB8	Homo sapiens NADH: subunidad B11 de la ubiquinona oxidoreductasa (NDUFB8), variante 2 de la transcripción, mRNA.
GINS4	Homo sapiens GINS complejo subunidad 4 (GINS4).

En la tabla se muestran los genes diferencialmente expresados del análisis de microarreglos de expresión. En rojo los genes sobre-expresados y en azul los sub-expresados. $P < 0.001$.

6.2 Evaluación de kits de extracción de DNA

Se evaluaron 3 kits comerciales para extracción de DNA de tejido con muestras control: DNeasy Blood and Tissue kit de QIAGEN, Gentra Puregene Tissue de QIAGEN y Isolate II Genomic DNA de Bioline. Se seleccionó el kit Isolate II Genomic DNA de Bioline, debido a que proporcionó un mayor rendimiento de DNA 15.2 µg, no requiere tratamiento previo de la muestra y es un protocolo corto

Tabla 7. Comparación de rendimiento de extracción de ADN.

Kit	Columna	Tiempo incubación	Rendimiento	260/280	260/230
DNeasy Blood and Tissue kit de QIAGEN,	Sí	24 hrs	9.6 µg	1.8	1.7
Isolate II Genomic DNA de Bioline.	Sí	3 hrs	15.2 µg	1.9	2.0
Gentra Puregene Tissue de QIAGEN	No	24 hrs	7.4 µg	1.8	1.8

6.2.1 Control de calidad del Análisis de metilación global mediante secuenciación masiva.

Se obtuvieron 22 librerías correspondientes a 10 pacientes y 2 muestras control de la región afectada y la región occipital. No fue posible secuenciar el resto de las muestras debido a la escasa cantidad de DNA obtenido o por no contar con cantidad suficiente de material de las dos muestras por paciente (región afectada y región occipital) y/o controles. Las muestras sometidas a secuenciación corresponden a:

- 2 pacientes grado IIIA
- 3 pacientes grado IIIV
- 2 pacientes grado IV
- 1 pacientes grado V
- 2 pacientes grado VA
- Controles 2: edad de 21 y 22 años

De los sujetos reclutados se trabajó con un total de 24 muestras: 10 de región afectada, 10 de región occipital, 1 control de vértex y 1 control de occipital. De las 24 librerías preparadas solo se sometieron 22 a secuenciación por parámetros de control de calidad. La calidad de las lecturas obtenidas fue $97.3\% \geq Q30$ y con una profundidad aproximada de 40X. Para el control de calidad se utilizó la herramienta TRIM GALORE con la cual se eliminaron adaptadores y lecturas de mala calidad ,y extremos de baja calidad. Con la acción anterior se obtuvo una disminución del número de lecturas pero aumento la calidad de las mismas. La longitud promedio de las lecturas obtenidas fue de 151 pb.

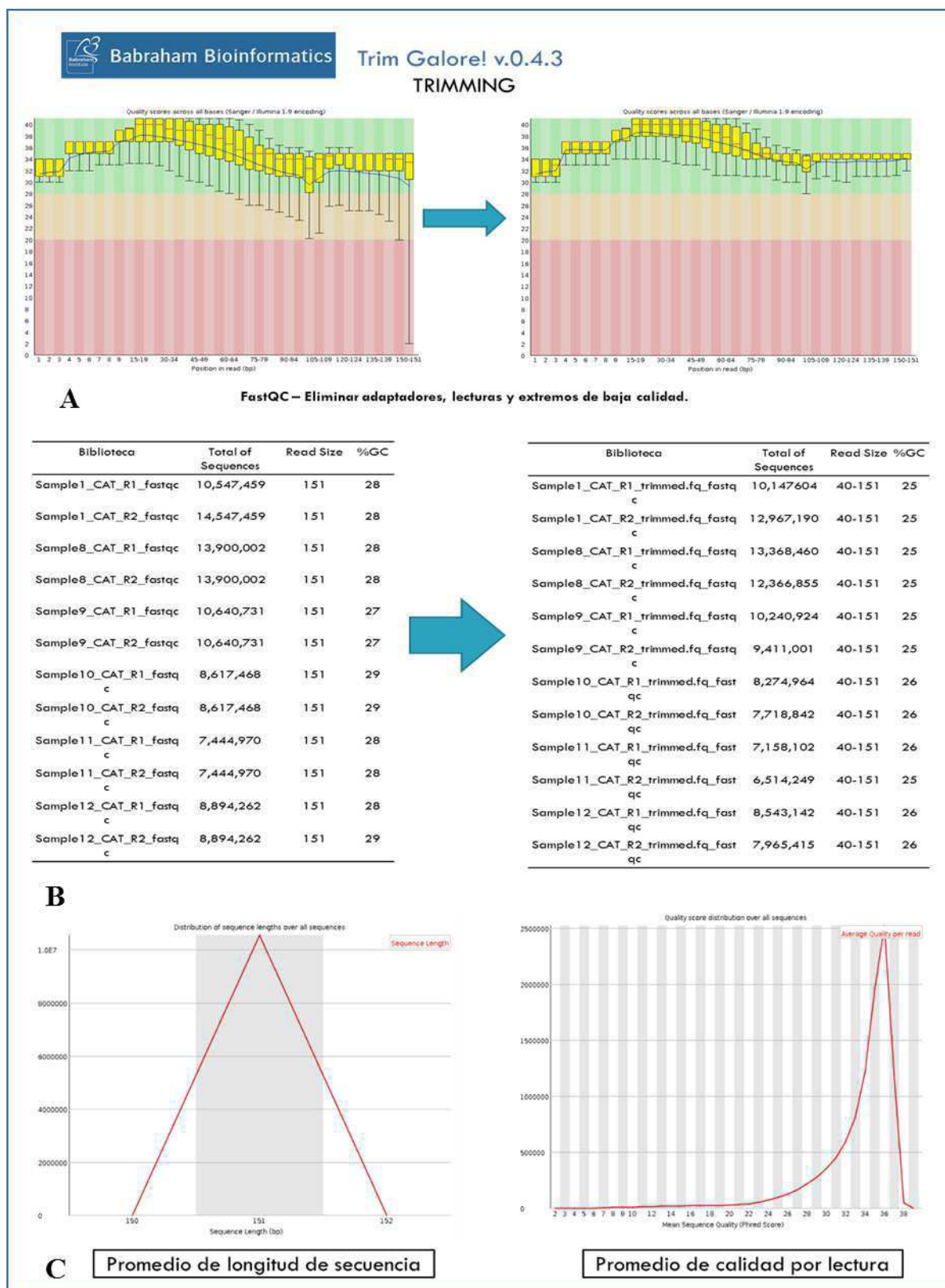


Figura 22. Control de calidad con TRIM GALORE. A) Aumento del número de lecturas con Q30. B) Reducción de lecturas posterior al filtrado. C) Promedio de longitud y calidad de lectura por secuencia.

6.2.2 Análisis de metilación global mediante secuenciación masiva.

Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa Bismark v0.17 de acuerdo al flujo establecido de trabajo (Figura 23). Las muestras mostraron alta similaridad de acuerdo al porcentaje de metilación con análisis de Pearson. Las muestras se agruparon de acuerdo al porcentaje de metilación por análisis de correlación de Pearson.

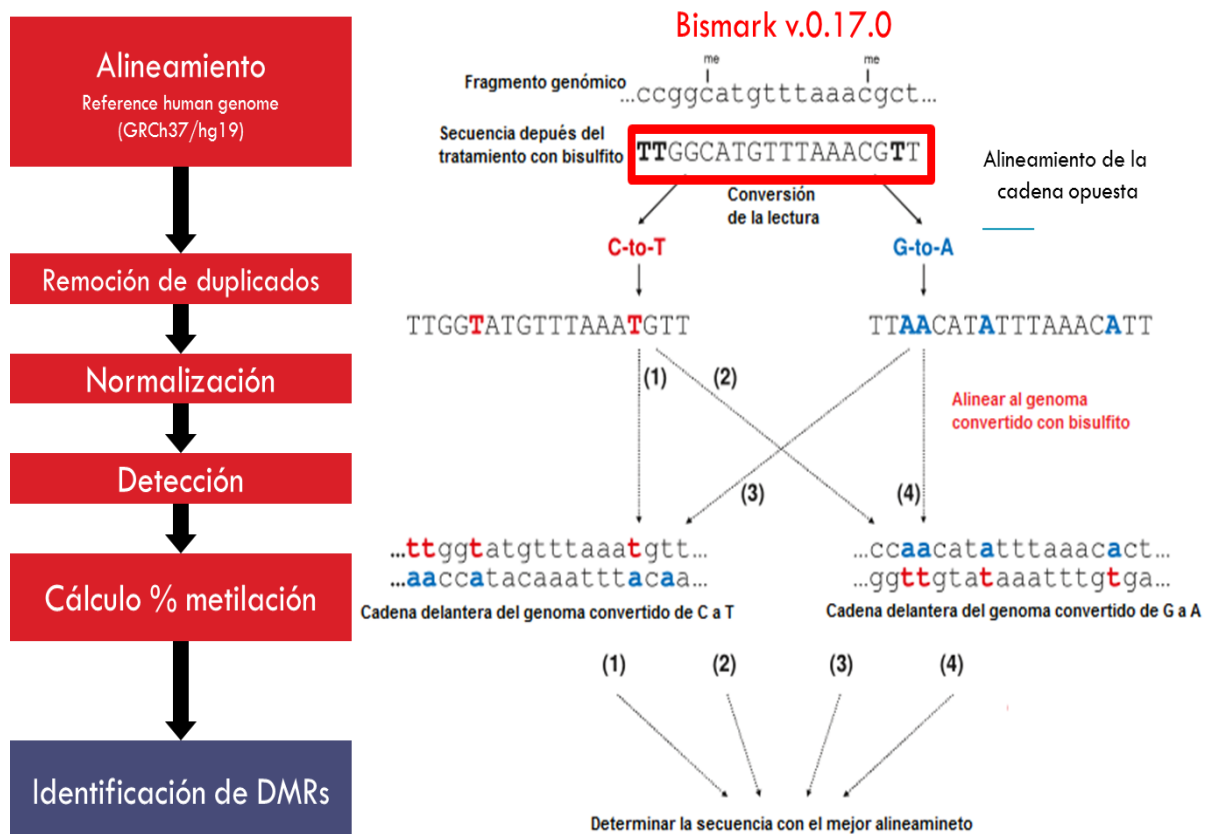


Figura 23. Flujo de trabajo para el análisis de metilación con Bismark v.0.17.0. DMRs(Differentially methylated regions).

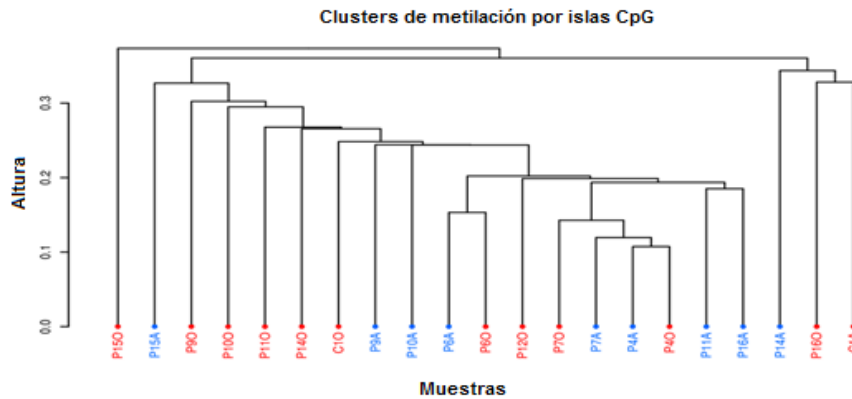


Figura 24. Análisis de correlación de Pearson de las muestras para el análisis de metilación por secuenciación masiva.

6.2.3 Identificación de sitios de metilación diferencial

Utilizando el software BISMARK v.0.17 comparando las lecturas de la región afectada contra las de la región occipital de pacientes y controles se logró identificar que el 54% de las regiones metiladas se encuentra en las regiones intergénicas, 30% en intrones, 3 % en exones y en la región promotora de los genes. El 46% de los sitios metilados corresponden a islas CpG, el 3% a costas CpG y 51% a otras regiones (Figura 25). En el análisis por cromosomas se observó que el cromosoma 7 presenta hipometilación cuando se comparan las regiones afectadas y las occipitales (Figura 26). Se identificó que el 36% de las regiones metiladas corresponden a potenciadores (Figura 26).

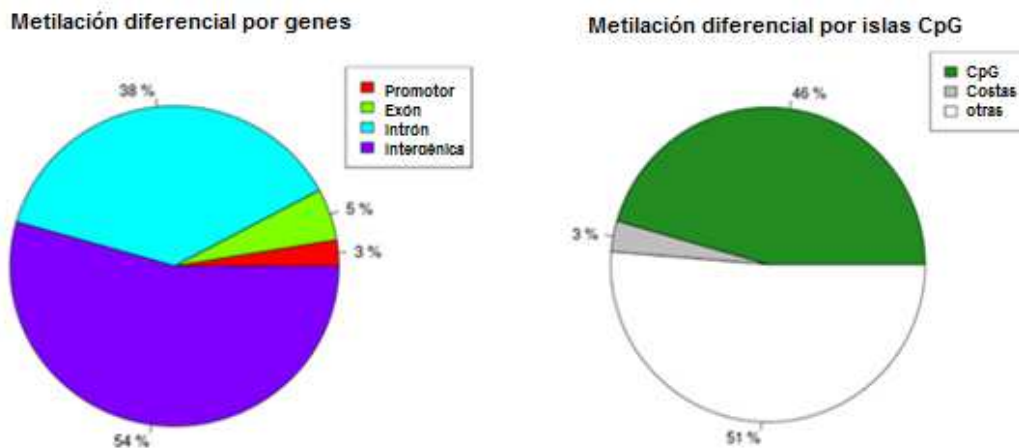


Figura 25. Análisis de metilación diferencial por genes e islas CpG.

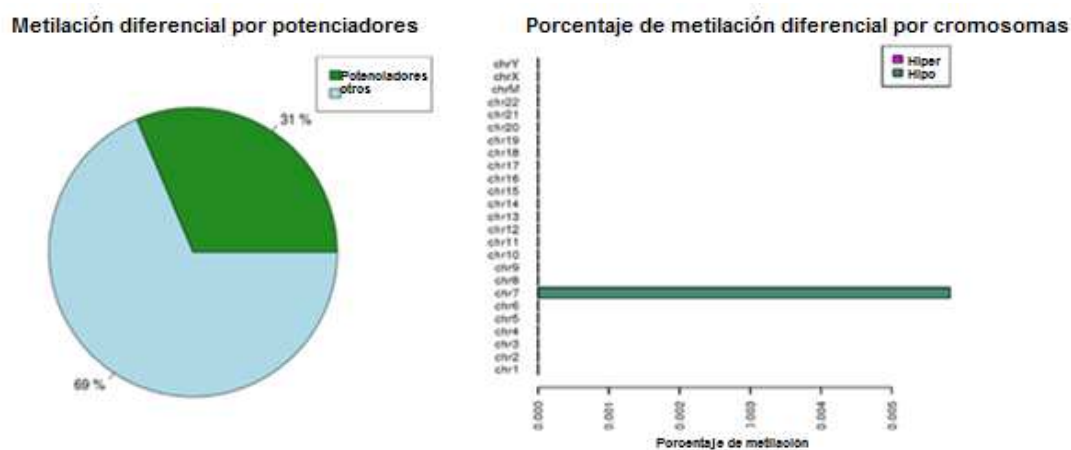


Figura 26. Análisis de metilación diferencial por potenciadores y cromosomas.

6.2.4 Análisis estadístico de metilación diferencial

Utilizando el paquete R y la herramienta Bioconductor se identificaron 18 regiones diferencialmente metiladas (DMRs) entre la región afectada y la región occipital de pacientes masculinos con alopecia androgenética y 2 sujetos control. El punto de corte para este análisis fue de un 20% de metilación diferencial y un valor de $p < 0.05$. Las

regiones diferencialmente metiladas se encuentran en el cuerpo génico de 14 genes. Se identificaron 13 DMRs en exones y 5 en intrones. Entre los genes con DMRs se encuentra *NINL*, *P2RY1*, *HTRA1*, *ENPP2*, *CCDC140*, *NKX6-1*, *PRMD6*, *PHLDA3*, *CCDC37*, *OPRM1*, *HOXA2* y *SFRP4*. La metilación diferencial de *SFRP4* resultó de interés pues este gen funciona como inhibidor de la vía de señalización WNT, la cual es de suma importancia para el desarrollo del ciclo de crecimiento del pelo. La metilación diferencial por cromosoma en el ensayo global se evidencio en el análisis estadístico, al incluir 6 regiones diferencialmente metiladas en el cromosoma 7. No se identificaron regiones promotoras diferencialmente metiladas.

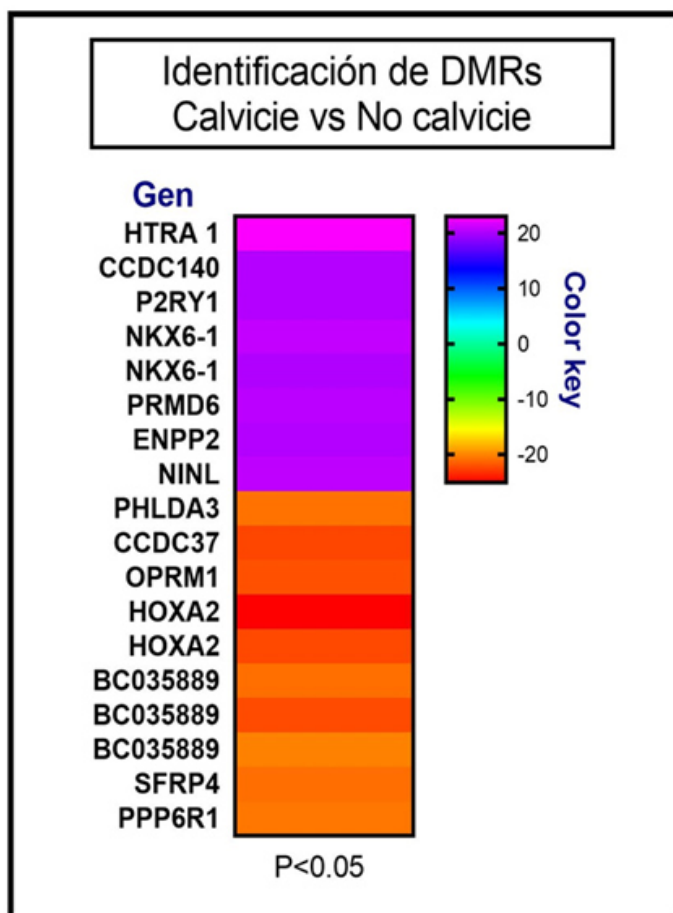


Figura 27. Genes diferencialmente metilados por secuenciación masiva. GraphPad 7.
A la derecha de la imagen se encuentra la clave de color que indica el porcentaje de metilación de los genes, hacia los rojos hipometilación y hacia los morados hipermetilación.

Tabla 8. Sitios de metilación diferencial de los GDM.

Cromosoma	Posición	Genes	p value
chr1	201435227	PHLDA3 (EXON 3/3, 2/2))	5.396201e-08
chr2	223167318	CCDC140 (INTRON 1/1)	4.626573e-09
chr3	126134444	CCDC37 (INTRON 4/16, 3/15)	3.986833e-10
chr3	152554234	P2RY1 (EXON 1/1)	1.316469e-08
chr4	85416853	NKX6-1 (EXON 2/3)	9.322602e-18
chr4	85417998	NKX6-1 (INTRON 1/2)	3.697748e-10
chr5	122434402	PRMD6 (INTRON 2/7,1/4)	9.184402e-14
chr6	154363174	OPRM1 (INTRON 1/3)	1.119863e-12
chr7	27140423	HOXA2 (EXON 2/2)	4.200568e-11
chr7	27140432	HOXA2 (EXON 2/2)	1.843863e-09
chr7	27161809	BC035889 (INTRON 1/3)	2.868651e-13
chr7	27161818	BC035889 (INTRON 1/3)	1.530802e-14
chr7	27161827	BC035889 (INTRON 1/3)	5.278968e-10
chr7	37955293	SFRP4 (INTRON 1/5)	2.828403e-09
chr8	120593817	ENPP2 (INTRON 19/25)	1.525533e-18
chr10	124254714	HTRA 1 (INTRON 3/8)	3.665708e-08
chr19	55765907	PPP6R1 (INTRON 1/23)	2.194094e-08
chr20	25478206	NINL (INTRON 9/23)	5.477733e-08

En la tabla se muestran los genes diferencialmente metilados identificados del análisis de secuenciación masiva tomando como punto de corte un 20% de metilación diferencial y un valor $p < 0.05$.

6.2.5 Análisis de Interacción funcional.

La lista de genes diferencialmente metilados se introdujo en la plataforma STRING v.10.0. Sin embargo, no se observó interacción entre los genes analizados.

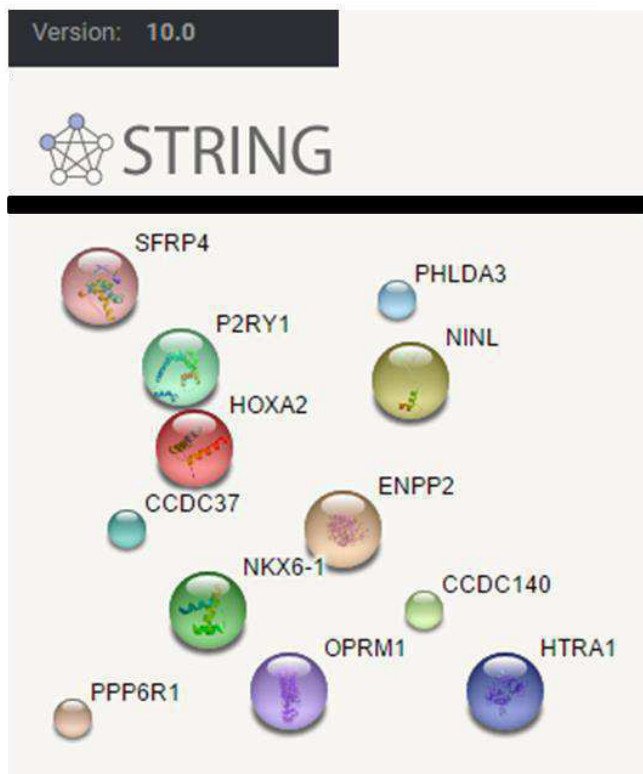


Figura 28. Mapa de interacción proteica de los GDM (genes diferencialmente metilados). No se observó interacción entre los GDM.

Resulta de interés la hipometilación del gen SFRP4 el cual es uno de los principales inhibidores de la vía WNT, la cual está asociada al crecimiento del pelo. Sin embargo, la metilación se localiza en región intrónica.

6.2.6 Vías de señalización asociadas a los GDM.

Los GDM están involucrados en respuesta a estímulos, procesos celulares, procesos del desarrollo, procesos metabólicos y regulación celular. Las principales vías

involucradas son WNT, vías de proteínas G heterotriméricas, vía de opiodes. Así como la vía PDGF.

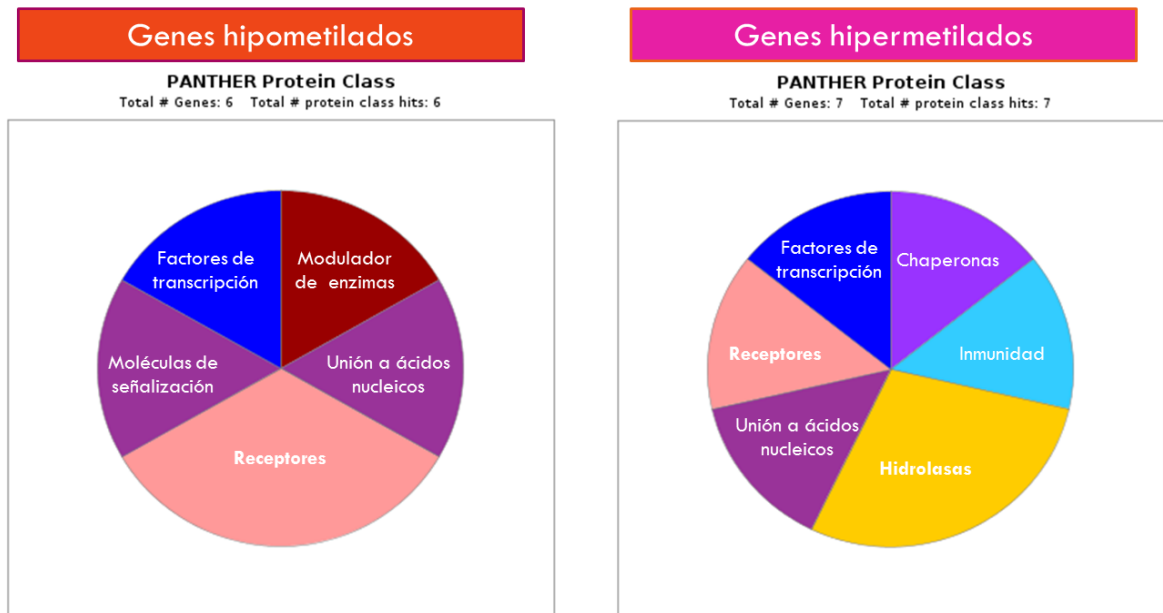


Figura 29. Análisis en PANTHER de los tipos de proteínas que codifican los GDM.

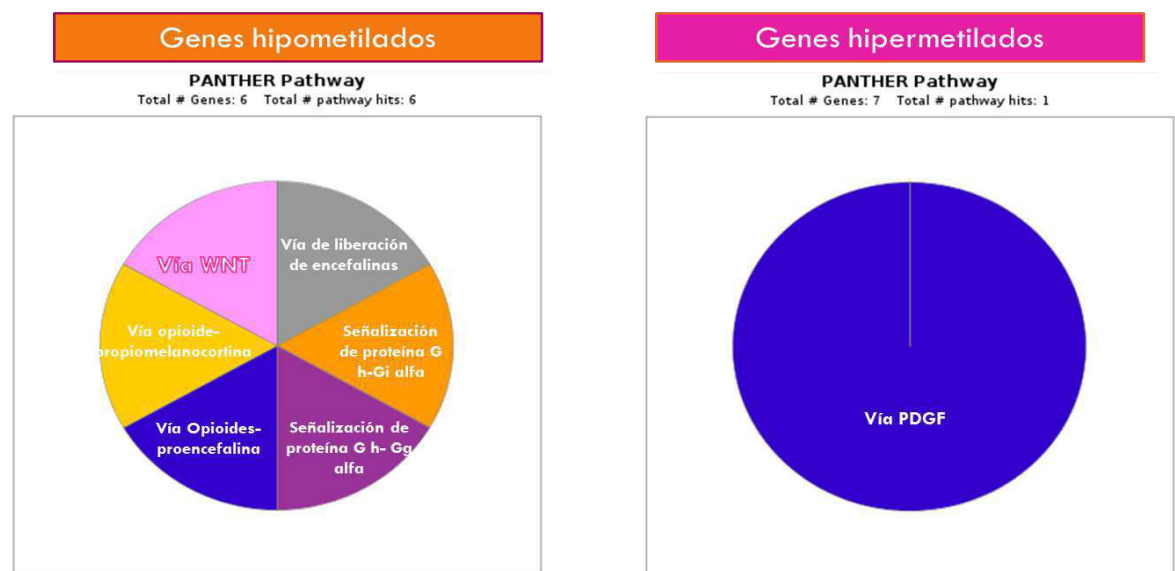


Figura 30. Análisis en PANTHER de las vías de señalización en las que participan los GDM.

6.3.1 Correlación entre los perfiles de expresión y metilación global y selección de genes candidatos.

Se realizó un análisis de interacción funcional con String v.10.0 en el cual fue posible observar la interacción entre *MLANA* y *TYR* anteriormente reportada, así como interacción entre el gen *WNT3* (Sobre-expresado) y *SFRP4* (hipometilado) (Figura 31).

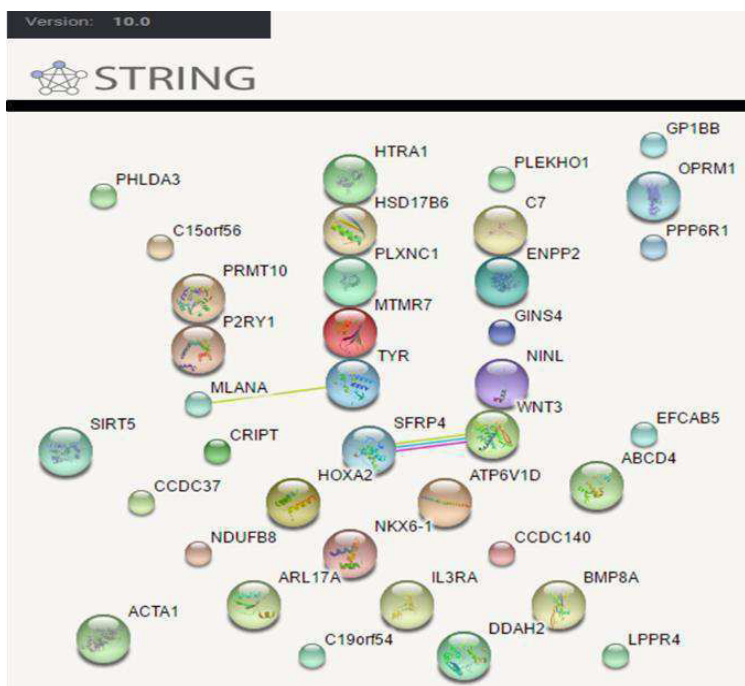


Figura 31. Mapa de interacción de los GDE y GDM.

El único gen que correlaciono en ambos enfoques fue *CCDC37* se encontró sobre-expresado e hipometilado en las áreas afectadas ($p < 0.05$ en ambos estudios). Sin embargo, se desconoce la función de este gen.

Tabla 9. Genes diferencialmente metilados y valores de expresión (P value).

Genes diferencialmente metilados (GDM)	Expresión (P value)
CCDC37	0.049431468
OPRM1	0.05433831
NKX6-1	0.135288114
ENPP2	0.166684784
PHLDA3	0.175728268
P2RY1	0.24995308
SFRP4	0.414324455
PPP6R1	0.504499447
HOXA2	0.561237217
CCDC140	0.776239595
HTRA1	0.959844192
NINL	0.964656588

No se encontraron más correlaciones entre genes diferencialmente expresados y genes diferencialmente metilados. Esto puede explicarse por la ausencia de DMRs en regiones reguladoras. Como no hubo correlaciones expresión-metilación, la selección de genes propuestos para la patofisiología molecular se enfocó en genes asociados con AAG en este y otros estudios, así como genes no asociados, pero de relevancia clínica. Los genes propuestos son *WNT3* y *HSD17B6*.

6.3 Análisis de expresión de los genes propuestos por PCR tiempo real.

Se confirmó la sobre-expresión de los genes propuestos *HSD17B6* y *WNT3* por PCR Tiempo Real con sondas Taqman en la región afectada de los pacientes vs la región occipital.

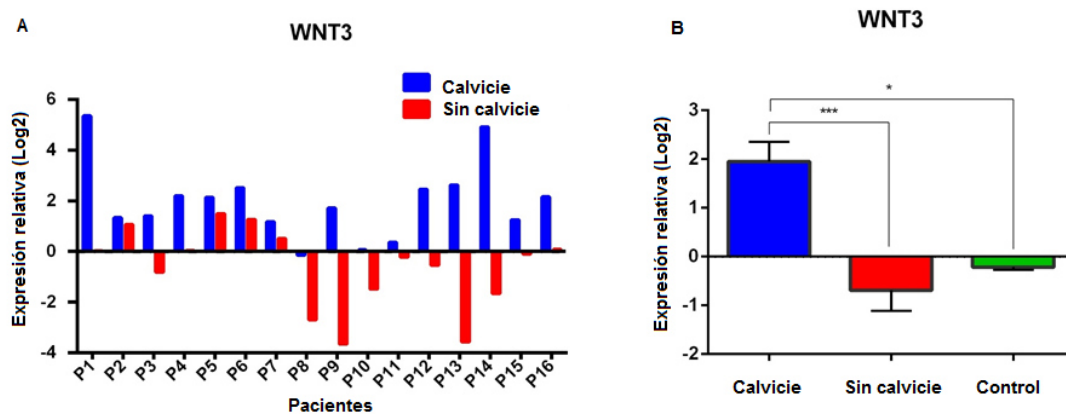


Figura 32. Expresión de *WNT3* por PCR Tiempo Real. A) Comparación de la expresión de *WNT3* entre la región con calvicie vs sin calvicie. B) Comparación de la expresión de *WNT3* por grupos. *WNT3* se sobre-expresa en la región de calvicie de los pacientes con AAG.

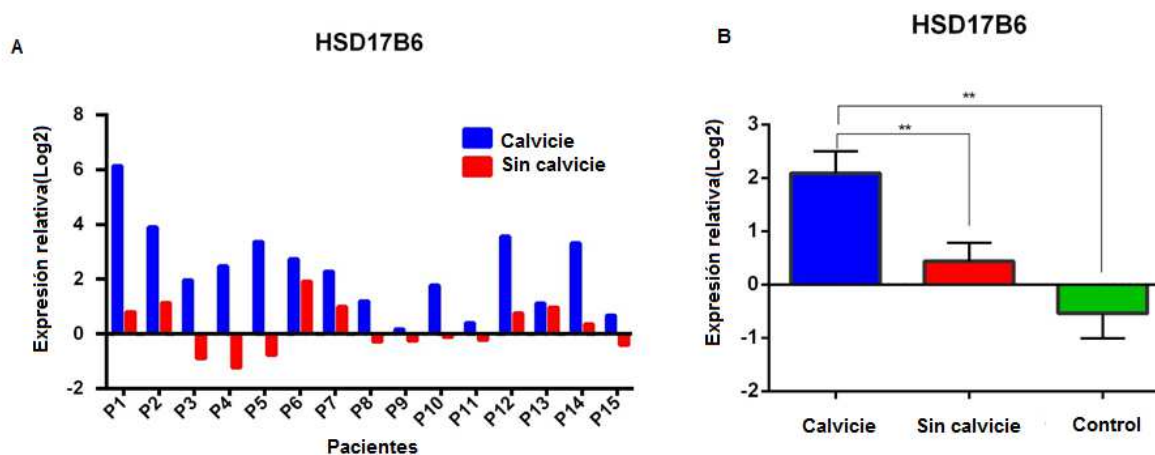


Figura 33. Expresión de *HSD17B6* por PCR Tiempo Real. A) Comparación de la expresión de *HSD17B6* entre la región con calvicie vs sin calvicie. B) Comparación de la expresión de *HSD17B6* por grupos. *HSD17B6* se sobre-expresa en la región de calvicie de los pacientes con AAG.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

7.1 Análisis de expresión génica en pacientes con AAG.

Se identificaron 34 DGE (genes diferencialmente expresados) entre la región de calvicie y la región sin calvicie de los pacientes con AAG ($P < 0.001$). Se identificaron 21 genes sobreexpresados y 13 genes subexpresados. Entre los genes sobre-expresados en la región de calvicie se encuentran genes pertenecientes a familias con importantes funciones y anteriormente asociados con alopecia androgenética como WNT3 y BMP8.

Genes sobre-expresados:

1. *C7* e *IL3RA*: Participan en respuesta inmune e inflamación.
2. *MLANA* y *TYR*: Síntesis de melanina/melanosoma.
3. *BMP8A*: Diferenciación celular y parece proteger contra apoptosis mediada por glucocorticoides (Kosá- KP et al., 2008).
4. *WNT3* (7q21.31): Diferenciación celular. Li et al., 2012. identificaron un SNP cercano a *IMP5*. En la misma región identificaron un SNP en *MAPT* asociado a E. Parkinson y AAG. Heilmann-Heimbach et al., 2016 (Heilmann-Heimbach S, Hochfeld LM, Paus R, Nöthen MM., 2016), resaltan la importancia de *WNT3* en AAG.

De manera interesante, *MLANA* y *TYR* se encontraron sobre-expresados en la región de calvicie, ambos genes participan en la síntesis de melanina y biogénesis del melanosoma. Debido a que el proceso de síntesis de melanina implica reacciones de oxidación en las cuales se generan especies reactivas de oxígeno(ROS), la sobreexpresión de estos genes se asocia con estrés oxidativo. Por otra parte, *TYR* ha sido asociado con alopecia areata y vitíligo autoinmune (Song et al., 1994).

En cuanto a las proteínas morfogénicas de hueso, se ha descrito que BMP2 y BMP4 participan en el crecimiento del cabello (Moon et al., 2010). BMP4 se localiza específicamente en la papila dérmica y regula la diferenciación del pelo. A la fecha no se había reportado la participación de *BMP8* en AAG. Kosá et al., sugieren que BMP8 presenta un rol protector contra el proceso de apoptosis inducido por la acción de glucocorticoides (Kosá et al., 2011). Lo anterior resulta de interés debido a que ya se ha asociado la presentación clínica de alopecia con la expresión de caspasas pro-apoptóticas en cuero cabelludo de la región de calvicie.

Los genes de la familia WNT han sido ampliamente estudiados por su importante participación en el ciclo de crecimiento del pelo, demostrando también que la alteración en la expresión de estos genes por acción de AR puede llevar a la aparición de AGA (Leirós et al., 2012). WNT3 juega un importante papel en la señalización célula-célula durante la morfogénesis y el desarrollo neural, se expresa en los folículos pilosos en desarrollo y maduros. Sin embargo, contrario a lo esperado, en este trabajo WNT3 se encontró sobre-expresado en la región de calvicie de los pacientes con AGA. Millar et al., 1996 demostraron que la sobreexpresión de WNT3 en piel de ratones transgénicos produce un fenotipo de pelo corto debido a la diferenciación alterada de las células precursoras de tallo del pelo del eje del pelo (Millar et al., 1999). Por otra parte, Kim et al., 2010, utilizando un modelo de ratón mutante del gen HR el cual es causante de la hipotricosis hereditaria de Marie Unna (MUHH) un trastorno poco común del pelo autosómico dominante, reportaron que la mutación generada en estos ratones produce una sobre- expresión del gen HR (hairless) con lo cual se inhibe la expresión de gen *Sfrp2* un inhibidor de la vía Wnt y esto coincidió con la activación de esta vía y un fenotipo de pérdida de pelo en los ratones. Además, también se ha demostrado que

la inducción excesiva de B-catenina, un regulador clave de la señalización Wnt genera que se formen las placodas prematuras del cabello y altera el crecimiento del folículo piloso en la morfogénesis (Närhi et al., 2008). Sugiriendo con esto que tanto la sub-regulación como la sobre-regulación del gen HR y la vía WNT pueden llevar a un fenotipo de Alopecia. *WNT3* se localiza en 17q21.31 un locus asociado con AAG según Li et al., 2012. quienes identificaron un SNP cercano a *IMP5* en esta región. Este mismo grupo de trabajo identificó un SNP en el gen *MAPT* asociado a E. Parkinson y AAG. Heilmann-Heimbach et al., 2016, resaltan la importancia de *WNT3* en AAG debido a su localización en este locus previamente asociado y a la importante función de los genes de la familia WNT en el ciclo de crecimiento del pelo. Los genes *ARL17* y *HEXIM1* se encontraron diferencialmente expresados en este trabajo y se localizan en el mismo locus asociado con AAG. Con el hallazgo de esta investigación se confirma que el locus 17q21.31 se encuentra asociado con AAG y se reporta por primera vez la participación directa de *WNT3* en esta entidad dermatológica.

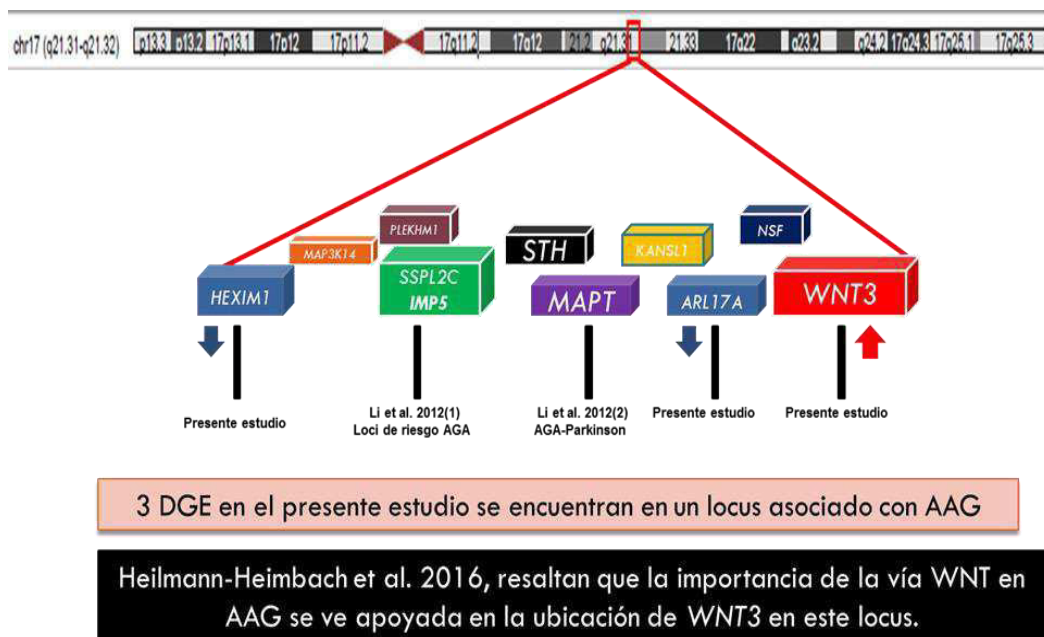


Figura 34. Locus 17q21.31 asociado con AAG. En flechas rojas y azules los GDE encontrados en este trabajo.

HSD17B6 se encontró sobreexpresado en este trabajo, se localiza en 12q13. La proteína codificada por este gen tiene actividades oxidorreductasa y epimerasa y está implicada en el catabolismo androgénico. La actividad oxidorreductasa puede convertir 3 alfa-adiol en dihidrotestosterona, mientras que la actividad epimerasa puede convertir la androsterona en epi-androsterona. Ambas reacciones usan NAD + como el cofactor preferido. Este gen es un miembro de la familia de la retinol deshidrogenasa. HSD17B6 es un gen clave en el metabolismo androgénico, polimorfismos en este gen han sido asociados a hiperandrogenismo y síndrome de ovario poliquístico (SOPQ). El hiperandrogenismo puede conducir al acné, piel con pelo y grasa, pérdida de cabello y otros síntomas clínicos, mientras que las mujeres que padecen SOPQ frecuentemente presentan AAG (Cela et al., 2003). De manera interesante, Ishizaki et al 2013, encontraron que la expresión de HSD17B6 fue mayor en 42 pacientes con cancer de próstata tratados con terapia de privación de andrógenos (ADT) en comparación con 100 sujetos no tratados. Sugiriendo que los $3\alpha/\beta$ -dioles representan potenciales precursores de DHT. Lo anterior resulta de interés pues el principal fármaco utilizado para tratar AGA es el Finasteride un inhibidor la enzima 5AR2, la cual ha sido más estudiada y asociada con esta entidad dermatológica y su función es convertir la testosterona a DHT. La enzima 5AR ha sido considerada como protagonista en la presentación de AGA. Por lo tanto, resulta interesante conocer que la enzima *HSD17B6* también participa de manera importante en la conversión de androgenos a DHT. *HSD17B6* presenta interacción funcional con el gen *SRD5A1*. Por lo tanto, con los hallazgos de este trabajo se sugiere que *HSD17B6* podría estar involucrado en la fisiopatología y sería un nuevo blanco terapéutico para AAG.

Las principales vías de señalización afectadas en este trabajo corresponden a la vía de señalización WNT así como las vías de síntesis de hormonas, lo cual correlaciona con

la presentación clínica de AAG. Otros genes asociados con alopecia androgénica como *PTGDS* y *GSLN* ($P = < 0.01$) también se encontraron sobreexpresados en la región de calvicie de los pacientes de estudio (Garza et al., 20012; Moon et al., 2004) apoyando por lo tanto, la función de estos genes como antagonistas del crecimiento del pelo.

Los genes *SDHA1*, *INSR* y *CYB5R4* identificados como sobre-expresados en la región de calvicie de los pacientes con AAG por Chew et al., 2017, también se encontraron sobre-expresados en la región de calvicie de los pacientes del presente trabajo a un valor de $p < 0.05$. Estos genes participan en la cadena respiratoria y la alteración en la expresión de estos genes puede afectar el estado de oxidación-reducción en los folículos pilosos afectados por AAG. El gen *PTGDS* reportado por Garza et al., 2012, presentó el mismo patrón de expresión en las muestras de AAG en el estudio de Chew et al., 2017, así como en el presente estudio. Por lo tanto, el hallazgo de la sobre-expresión de *PTGDS* en la región de calvicie de los pacientes afectados por AAG en 2 grupos independientes confirma la participación de este en la patofisiología de la AAG.

A pesar de que Chew et al., 2017 realizaron su estudio con un mayor número de muestras (20 pacientes y 10 controles) que en el presente trabajo (16 pacientes y 4 controles) se puede considerar que este trabajo presenta una muestra más homogénea y representativa del microambiente folicular ya que se trabajó directamente con biopsias de las regiones afectadas y no afectadas, mientras que el grupo de Chew et al., 2017, trabajaron con muestras de Unidad de Extracción Folicular (UEF) de sitios diferentes de cada paciente. Las Unidades de extracción folicular son tomadas durante los trasplantes de cabello y son pequeñas unidades de aproximadamente 1 mm. Generalmente, se considera que la biopsia es la mejor opción ya que con la UEF se obtiene una escasa cantidad de ácidos nucleicos motivo por el cual los autores sugieren

que es recomendado realizar un transcriptoma individual por UEF lo cual es poco viable tanto para investigación como para diagnóstico debido al costo elevado del ensayo.

Otro punto a favor del presente trabajo comparado con el de Chew et al., 2017, es que los resultados obtenidos en este trabajo se basan en los perfiles de expresión a un valor de $p < 0.001$ de 15 pacientes con AAG en comparación con los 6 pacientes de dicho estudio a un $p < 0.05$. Por lo tanto, este trabajo presenta una mayor astringencia estadística.

Recientemente, Michel et al., 2017 publicaron un estudio de análisis de expresión en hombres con AAG, el cual reveló que los genes que codifican las enzimas de los gránulos de los mastocitos, los mediadores inmunes inflamatorios y asociados con inmunoglobulinas fueron significativamente sobre-expresados en AGA. Mientras que los genes sub-expresados parecen estar asociados con las vías de señalización Wnt / β -catenina y BMP / TGF- β . Aunque la participación de estas vías en la regeneración del folículo piloso está bien descrita, la interpretación funcional de los datos transcriptómicos pone de relieve diferentes eventos que explican su inhibición en la AAG (Michel et al., 2017). Este grupo de investigación, también encontró expresión diferencial de *PTGDS* entre la región afectada de los pacientes y los controles.

Michel et al., 2017 realizan una comparación de la expresión génica entre las regiones de vértex de pacientes y controles, sin embargo, es bien conocido que la comparación de región afectada vs región occipital del mismo paciente como autocontrol arroja un mayor poder estadístico. A pesar de trabajar con biopsias de cuero cabelludo este estudio difiere del presente trabajo en la cobertura del microarreglo utilizado Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays (onecolor, 8x60K, v2) vs U133 Plus 2.0 de Affymetrix. U133 Plus 2.0, utilizado en el presente trabajo analiza el nivel de

expresión de más de 47.000 transcritos y variantes, incluyendo 38.500 genes humanos bien caracterizados, esta compuesto de más de 54.000 conjuntos de sondas y 1.300.000 oligonucleótidos distintos, además presentan mayor precisión y reproducibilidad que cualquier otra plataforma de microarreglos.

La patofisiología de AAG se ha asociado con el metabolismo androgénico, procesos inflamatorios y apoptosis. Los resultados obtenidos apoyan la relevancia del metabolismo androgénico y de WNT3 en la patología de la AAG.

Notablemente, nuestro estudio de expresión global no muestra diferencias entre las áreas afectada y occipital para AR y SRD5A1/2. Sin embargo, la sobre-expresión del gen HSD17B6 sugeriría sobreproducción local de DHT y sus efectos en AAG.

7.2 Analisis de metilación por secuenciación masiva en pacientes con AAG.

Se identificaron 18 DMRs entre zonas afectadas y occipitales de pacientes con AAG (20% de MethDif y $p < 0.05$). Las DMRs se localizan en el cuerpo génico (intrones y exones) de 14 genes, ninguna en regiones intergénicas (incluyendo promotores). Hay controversias entre correlaciones positivas y negativas de DMRs en el cuerpo génico para la transcripción. Estas afectarían el empalme de genes y el control de la sincronización del desarrollo de la expresión. 7 DMRs se localizan en el cromosoma 7. No hay interacciones entre los genes diferencialmente metilados (STRING v10.0). El gen *SFRP4* uno de los principales inhibidores de la vía WNT resultó hipometilado, sin embargo, como se mencionó anteriormente el sitio de metilación corresponde a un intrón y no a una región reguladora o promotora del mismo. Hipotetizando que la hipometilación correspondiera a una región promotora, esta supone un aumento en la expresión de *SFRP4* generando la inhibición de la vía WNT. Sin embargo, los genes de esta vía se encontraron con expresión similar en ambas regiones a excepción de *WNT3* que se sobre-expresó en la región de calvicie.

Este trabajo es el primero a nivel mundial en evaluar el estado de metilación global en pacientes con alopecia androgenética. En el 2010, Cobb et al, pusieron de manifiesto la metilación diferencial del gen del receptor de andrógenos(AR), sin embargo, en un análisis detallado nuestro grupo de trabajo encontró que los patrones de metilación, así como los de expresión son similares en las regiones afectadas y occipitales de los pacientes con AAG. Esta diferencia puede ser por la técnica utilizada ya que Cobb et al, trabajaron con secuenciación Sanger en una región específica tomando como punto de corte escasos sitios CpG, mientras que en la secuenciación masiva se evaluó el gen completo y se compararon los sitios entre las dos regiones, así como la profundidad de las lecturas. También es posible que el origen de las muestras contribuya a las diferencias encontradas entre nuestros resultados y los de Cobb et al, ya que ellos trabajaron con células de papila dérmica proveniente de cultivo de muestras de cuero cabelludo de los pacientes mientras que en este trabajo se realizó el analisis directamente a la biopsia de cuero cabelludo. También se realizó un analisis gen-especifico de *SRD5A1/2* y *WNT10A* por ser genes íntimamente asociados con AAG, sin embargo, tampoco se encontró diferencia en los perfiles de metilación de estos genes. La principal vía de señalización de interés en AAG afectada en el análisis de metilación diferencial fue la vía de señalización WNT, sin embargo, esta no correlacionó con la expresión génica.

CONCLUSIONES

- Se destaca la sobre-expresión de *HSD17B6* en la región afectada por AAG. Este resultado refuerza la importancia del metabolismo androgénico en AAG, pero en este estudio se propone que el efecto del metabolismo androgénico se debería a la sobre-expresión de *HSD17B6*, más que en la disfunción de *SRD5A1/2*. Proponiendo a *HSD17B6* como un blanco terapéutico interesante para el tratamiento de AAG.
- Este trabajo muestra la primera evidencia del posible efecto de *HSD17B6* en AAG y propone a este gen como un blanco terapéutico interesante para el tratamiento de AAG.
- Por otra parte, la sobre-expresión de *WNT3* en la región de calvicie de los pacientes con AAG confirma la asociación de este locus (17q21.31) con esta entidad dermatológica.
- Se identificó la sobre-expresión de *MLANA* y *TYR* genes involucrados en la síntesis de melanina y formación del melanosoma, cuya función se ha asociado con incremento local de especies reactivas de oxígeno, lo cual ya se ha asociado con alopecia.
- Se observa la sobre-expresión de genes involucrados en la respuesta inmune e inflamación (*C7* e *ILR3A*).
- La expresión de los principales genes asociados con AAG (*AR*, *WNT10A*, *SRD5A1/2*) resultó similar en las regiones afectadas por alopecia y la región occipital de pacientes y controles.
- Se confirma la participación de *PTGDS* en la patofisiología de AAG, al encontrarse sobre-expresada en la región de calvicie de los pacientes.

- Las principales vías de señalización en las que participan los genes diferencialmente expresados son vías de biosíntesis de hormonas esteroideas, vía WNT, vía TGFB, vía de la coagulación sanguínea y la vía de señalización de caderinas.
- El presente trabajo muestra el primer ensayo de metilación global por secuenciación masiva en pacientes masculinos con AAG.
- No se encontraron regiones promotoras o reguladores en las regiones diferencialmente metiladas entre las regiones afectadas y occipitales del ensayo de metilación global.
- *SFRP4*, inhibidor de la vía de señalización WNT, se encontró hipometilado en el intrón 1 de la región de calvicie de los pacientes.
- No se observó correlación entre los genes diferencialmente expresados y los diferencialmente metilados en los pacientes con AAG.
- Solo se identificó asociación entre la expresión y metilación observada del gen *CCDC37*, pero se desconoce la función del mismo.
- Las vías de señalización en las que intervienen los genes diferencialmente metilados son: vía WNT, vía de encefalinas, de proopiomelanocortina y la vía PDGF.
- Los resultados obtenidos sugieren la importancia del metabolismo androgénico (*HSD17B6*) y del estrés oxidativo (*MLANA* y *TYR*), así como la participación de la vía de señalización WNT (*WNT3*) en la presentación clínica de la AAG.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. (2008) Imprinting and genetic disease: Angelman, Prader-Willi and Beckwith-Wiedemann syndromes. *Nature Education*, 1(1):129).
- Alonso L, Fuchs E. (2006). The hair cycle. *J Cell Sci*, 119(3):391-3.
- Cela E, Robertson C, Rush K, Kousta E, White DM, Wilson H, Lyons G, Kingsley P, McCarthy MI, Franks S. (2003). Prevalence of polycystic ovaries in women with androgenic alopecia. *Eur J Endocrinol*, 149(5):439-42.
- Chew EG, Ho BS, Ramasamy S, Dawson T, Tennakoon C, Liu X, Leong WM, Yang SY, Lim SY, Jaffar H, Hillmer AM, Bigliardi-Qi M, Bigliardi PL.(2017). Comparative transcriptome profiling provides new insights into mechanisms of androgenetic alopecia progression. *The British journal of dermatology*, 176(1):265-9.
- Cobb JE, White SJ, Harrap S & Ellis J. (2009). Androgen receptor copy number variation and androgenetic alopecia: a case-control study. *PloS One*, 4(4), e5081.
- Cobb JE, Wong NC, Yip LW, Martinick J, Bosnich R, Sinclair RD, Ellis J. (2011). Evidence of increased DNA methylation of the androgen receptor gene in occipital hair follicles from men with androgenetic alopecia. *The British Journal of Dermatology*, 165(1), 210–3.
- Costello JF, Plass C. (2001). Methylation matters. *J Med Genet*, 38: 285-303.
- Ellis JA, Scurrah KJ, Cobb JE, Zaloumis SG, Duncan AE & Harrap SB. (2007). Baldness and the androgen receptor: the AR polyglycine repeat polymorphism does not confer susceptibility to androgenetic alopecia. *Human Genetics*, 121(3-4), 451.457.
- Ellis J, Stebbing M, & Harrap S. (2001). Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness. *Journal of Investigative Dermatology*, 452–455.
- Feinberg AP. (2000).The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Clin Invest*, 106: 739-40.
- Gardiner-Garden M and M Frommer.(1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J MolBiol*, 196(2) 261-82.
- Garza L, Liu Y, & Yang, Z. (2012). Prostaglandin D2 inhibits hair growth and is elevated in bald scalp of men with androgenetic alopecia. *Science Translational*, 4(126).
- Goodarzi H & Abbasi, A. (2012). Differential expression analysis of balding and nonbalding dermal papilla microRNAs in male pattern baldness with a microRNA amplification profiling method. *Br J Dermatol*, 166(5), 1010–6.

- Hadshiew IM, Foitzik K, Arck PC, Paus R. (2004). Burden of hair loss: stress and the underestimated psychosocial impact of telogen effluvium and androgenetic alopecia. . *J Invest Dermatol*, 123(3):455-7.
- Hamilton, J. (1942). Male hormone stimulation is prerequisite and an incitant in common baldness. *American Journal of Anatomy*, 71(451), 473–475.
- Hamilton JB. Patterned loss of hair in man; types and incidence. (1951). *Ann N Y Acad Sci*, 53: 708 – 28.
- Heilmann S, Kiefer AK, Fricker N, Drichel D, Hillmer AM, Herold C, Nöthen MM. (2013). Androgenetic alopecia: identification of four genetic risk loci and evidence for the contribution of WNT signaling to its etiology. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(6), 1489–96.
- Heilmann S, Brockschmidt FF, Hillmer AM, Hanneken S, Eigelshoven S, Ludwig, KU, Herold C, Mangold E, Becker T, Kruse R, Knapp M and Nöthen MM. (2013). Evidence for a polygenic contribution to androgenetic alopecia. *British Journal of Dermatology*, 169: 927–930.
- Heilmann-Heimbach S, Hochfeld LM, Paus R, Nöthen MM. (2016). Hunting the genes in male-pattern alopecia: how important are they, how close are we and what will they tell us?. *Exp Dermatol*, 25(4):251-7.
- Hillmer A M , Flaquer A , Hanneken S , Eigelshoven S , Kortu A , Brockschmidt, F F, Kruse R. (2008). Genome-wide Scan and Fine-Mapping Linkage Study of Androgenetic Alopecia Reveals a Locus on Chromosome 3q26. *Am J Hum Genet*, 82(3):737-43.
- Hillmer AM, Hanneken S, Ritzmann S, Becker T, Freudenberg J, Brockschmidt F. F, Nothen, M. M. (2005). Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia. *American Journal of Human Genetics*, 77(1), 140–8. doi:10.1086/431425
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic acids research*, 31(4):e15.
- Ishizaki F, Nishiyama T, Kawasaki T, Miyashiro Y, Hara N, Takizawa I, Naito M, Takahasi K. (2013). Androgen deprivation promotes intratumoral synthesis of dihydrotestosterone from androgen metabolites in prostate cancer. *Sci Rep*, 3:1528.
- Karnik P, Shah S, Dvorkin-Wininger Y, Oshtory S, Mirmirani P. (2013). Microarray analysis of androgenetic and senescent alopecia: comparison of gene expression shows two distinct profiles. *Journal of dermatological science*, 72(2):183-6.
- Kaufman, K. D. (2002). Androgens and alopecia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198(1-2), 89–95.

Kim JK, Kim E, Baek IC, Kim BK, Cho AR, Kim TY.(2010). Overexpression of Hr links excessive induction of Wnt signaling to Marie Unna hereditary hypotrichosis. *Human molecular genetics*, 19(3):445-53.

Kósa JP, Kis A, Bácsi K, Balla B, Nagy Z, Takács I, Speer G, Lakatos P. (2011). The protective role of bone morphogenetic protein-8 in the glucocorticoid-induced apoptosis on bone cells. *Bone*, 48(5):1052-7.

Leirós GJ, Attorresi AI, Balañá ME. (2012). Hair follicle stem cell differentiation is inhibited through cross-talk between Wnt/ β -catenin and androgen signalling in dermal papilla cells from patients with androgenetic alopecia. *Br J Dermatol*, 166(5):1035-42.

Li R, Brockschmidt FF, Kiefer AK, Stefansson H, Nyholt DR, Song K, Richards JB. (2012). Six novel susceptibility Loci for early-onset androgenetic alopecia and their unexpected association with common diseases. *PLoS Genetics*, 8(5), e1002746.

Liang B, Yang C, Zuo X, Li Y, Ding Y, Sheng Y, Zhang X. (2013). Genetic variants at 20p11 confer risk to androgenetic alopecia in the Chinese Han population. *PloS One*, 8(8), e71771.

Michel L, Reygagne P, Benech P, Jean-Louis F, Scalvino S, Ly Ka So S, Hamidou Z, Bianovici S, Pouch J, Ducos B, Bonnet M, Bensussan A, Patatian, Lati E, Wdzieczak-Bakala J, Choulot JC, Loing E, Hocquaux M.(2017). Study of gene expression alteration in male androgenetic alopecia: evidence of predominant molecular signaling pathways. *Br J Dermatol*.

Midorikawa T, Chikazawa T, Yoshino T, Takada K & Arase S. (2004a). Different gene expression profile observed in dermal papilla cells related to androgenic alopecia by DNA macroarray analysis. *Journal of Dermatological Science*, 36(1), 25–32.

Millar SE, Willert K, Salinas PC, Roelink H, Nusse R, Sussman DJ, et al. WNT signaling in the control of hair growth and structure. *Developmental biology* 1999; 207(1):133-49.

Moon PG, Kwack MH, Lee JE, Cho YE, Park JH, Hwang D, Baek MC. (2013). Proteomic analysis of balding and non-balding mesenchyme-derived dermal papilla cells from androgenetic alopecia patients using on-line two-dimensional reversed phase-reversed phase LC-MS/MS. *Journal of Proteomics*, 85, 174–91.

Nakao M. (2001). Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278: 25-31.

Närhi K, Järvinen E, Birchmeier W, Taketo MM, Mikkola ML, Thesleff I.(2008). Sustained epithelial beta-catenin activity induces precocious hair development but disrupts hair follicle down-growth and hair shaft formation. *Development*, 135(6):1019-28.

- Panchaprateep R, Korkij W & Asawanonda P. (2011). Brain-derived nerve factor and neurotrophins in androgenetic alopecia. *The British Journal of Dermatology*, 165(5), 997–1002.
- Paulsen M, Ferguson-Smith AC. (2001). DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol*, 195: 97-110.
- Prodi DA, Pirastu N, Maninchedda G, Sassu A, Picciau A, Palmas MA, Pirastu M. (2008). EDA2R is associated with androgenetic alopecia. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(9), 2268–70.
- Rathnayake D, & Sinclair, R. (2010). Male androgenetic alopecia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(8), 1295–1304.
- Rogers GE, Powell BC. (1993). Organization and expression of hair follicle genes. *J Invest Dermatol*, 101(1 Suppl):50S-55S.
- Sinclair, R. (1998). Clinical review: Male pattern androgenetic alopecia. *BMJ*, 317, 865–869.
- Song YH, Connor E, Li Y, Zorovich B, Balducci P, Maclaren N. (1994). The role of tyrosinase in autoimmune vitiligo. *Lancet*, 344(8929):1049-52.
- Suro Reyes JA, Gutiérrez Fernández Luisa, Ruiz Ávila Javier, Bouhanna Pierre. (2007). El pelo. Generalidades y funciones. *DCMQ*, 5(4):218-223.

ANEXOS

ANEXOS

CUESTIONARIO DE VALORACIÓN DE PACIENTES

ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN Y DE METILACIÓN DEL GENOMA EN PACIENTES MASCULINOS CON ALOPECIA ANDROGENÉTICA

CUESTIONARIO DEMOGRÁFICO

Clave _____

Nombre del paciente _____

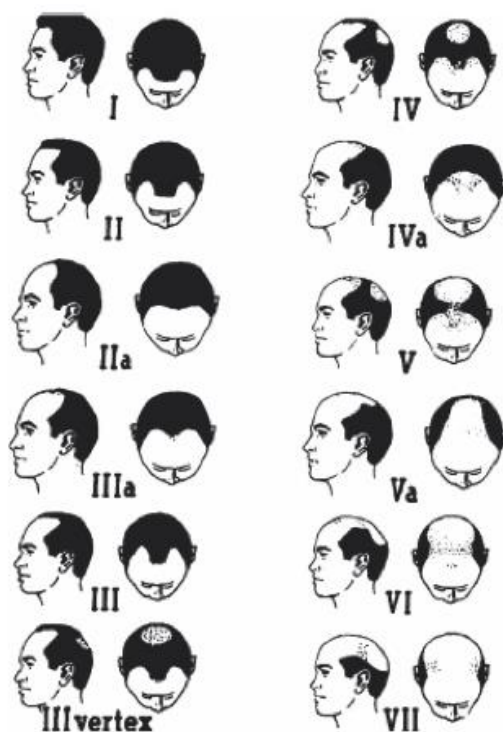
Edad: _____

Lugar de nacimiento: _____

Lugar de residencia actual: _____

Teléfono de contacto: _____

Clasificación clínica (Escala Hamilton-Norwood III –IV)



AAG: _____

Edad de inicio: _____

Tratamientos actuales para AAG	SI	NO
--------------------------------	----	----

Especificar
tratamiento _____

Trasplante de pelo previo:	SI	NO
----------------------------	----	----

Antecedentes Personales:

Diabetes mellitus (DM)	SI	NO
------------------------	----	----

Hipertensión arterial (HTA)	SI	NO
-----------------------------	----	----

Hiperplasia prostática (HP)	SI	NO
-----------------------------	----	----

Cáncer de próstata (CaP)	SI	NO
--------------------------	----	----

Síntomas de retención urinaria	SI	NO
--------------------------------	----	----

Enfermedades psiquiátricas	SI	NO
----------------------------	----	----

Otra enfermedad sistémica activa (especificar)

Medicamentos o tratamientos
actuales _____

Antecedentes Familiares:

Lugar de nacimiento del abuelo materno

Lugar de nacimiento de la abuela materna

Lugar de nacimiento del abuelo
paterno _____

Lugar de nacimiento de la abuela paterna

Abuelo materno afectado	SI	NO
Abuela materna afectada	SI	NO
Abuelo paterno afectado	SI	NO
Abuela materna afectada	SI	NO
Padre afectado	SI	NO
Madre afectada	SI	NO
Número de hermanas _____	Número de hermanas afectadas _____	
Número de hermanos _____	Número de hermanos afectados _____	
Número de hijos _____	Número de hijos afectados _____	
Número de hijas _____	Número de hijas afectadas _____	
Antecedentes familiares de DM (especificar) _____		
Antecedentes familiares de HTA (especificar) _____		
Antecedentes familiares de HP (especificar) _____		
Antecedentes familiares de CaP (especificar) _____		

ANEXO 2: Carta de consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GLOBAL (RNAs), DE MicroRNAs Y DE CAMBIOS EPIGENÓMICOS EN PACIENTES MASCULINOS CON ALOPECIA ANDROGENÉTICA

Usted ha sido invitado (a) a participar en este estudio de investigación. Este documento tiene toda la información sobre este estudio. Tómese el tiempo necesario para que lo lea y haga cualquier pregunta que pudiera tener a su médico o personal del estudio de investigación.

2.- LOS INVESTIGADORES

Dr. Augusto Rojas Martínez (Investigador Principal, Investigador del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias para la Salud y Profesor del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, UANL)

Dra. Claudia Ivette Ancer Arellano (Estudiante de Doctorado en Medicina, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, UANL)

M.C. Lizeth Alejandra Martínez Jacobo. (Estudiante de Doctorado en Ciencias, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, UANL).

Est. Medicina Yelyann Magory Márquez González. (Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina, UANL).

Dra. Rocío Ortiz López (Profesor del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y Responsable de la Unidad de Biología Molecular y Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias para la Salud, ambos de la UANL).

Dr. Med. Jesús Ancer Rodríguez (Jefe y Maestro del Servicio y Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario, UANL).

Dr. Med. Osvaldo Tomás Vázquez Martínez (Maestro del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, UANL)

Dr. Med. Carlos Eduardo Medina de la Garza (Director e Investigador del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias para la Salud y Maestro del Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, UANL).

Dr. Jorge de Jesús Ocampo Candiani (Jefe y Maestro del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, UANL).

Dr. Sergio Eduardo González González (Maestro del Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, UANL).

Centro de Contacto:

Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González” ubicado en Madero y Gonzalitos s/n en la colonia Mitras Centro. Teléfono: 83481465 y 83480383.

3.- ACERCA DE ESTE ESTUDIO.

El problema de la calvicie es el tipo más común de caída de cabello, afecta hasta el 80 % de los hombres arriba de los 70 años de edad y hasta la fecha no existen estudios para valorar los factores genéticos o hereditarios que predisponen a que en algunos sujetos se presente y otros no. Está demostrado que el tener antecedentes familiares del problema, ya sea por parte de mamá o papá, nos hacen tener más probabilidades de padecerlo pero aún esto no está definido.

En este estudio se tomarán 2 muestras de piel, una de la región afectada con poco cabello y otra de la región de la nuca, las cuales se analizarán para ver los patrones de herencia que generan que ciertas partes del cuero cabelludo la calvicie se presente y en otras no. Los resultados obtenidos de este estudio nos podrían ayudar a diseñar un tratamiento más específico y eficaz para prevenir y tratar la calvicie.

4.- ¿PARA QUE SE LLEVA A CABO ESTE ESTUDIO?

Este estudio tiene como objetivo poder identificar que genes o alteraciones moleculares están implicadas en la aparición de la calvicie y por tanto nos podrían sugerir tratamientos más específicos con mejores resultados tanto en la prevención como en el tratamiento.

5.- ¿CUÁLES SON LOS REQUISITOS PARA PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Participaran en este estudio pacientes masculinos de entre 25 y 50 años de edad que presenten un grado de afección de calvicie III – IV en la escala de Hamilton-Norwood (Esto sera evaluado por el investigador).

Serán excluidos aquellos individuos que presenten o hayan recibido tratamiento para enfermedades sistémicas (Diabetes Mellitus e Hipertensión arterial), aquellos que hayan utilizado tratamientos para la calvicie en los últimos 6 meses (finasterida, minoxidil o aminexil) o tratamientos para la hiperplasia prostática benigna en los últimos 6 meses.

Además participaran como controles individuos masculinos sanos de entre 25 y 50 años, sin antecedentes ni tratamientos para enfermedades sistémicas, que no presenten ningún problema de calvicie o caída de cabello ni que hayan recibido tratamientos para esta última en los últimos 6 meses.

6.- ¿QUÉ SE ME PEDIRÁ QUE HAGA?

Si usted se ofrece como voluntario para participar en este estudio, se le pedirá que acuda a una visita para la toma de 2 muestras de piel, una de la región afectada con calvicie y otra de la región de la nuca. Este procedimiento se realizará con aplicación local de xilocaína con epinefrina, se tomarán las muestras de piel de cada sitio (aproximadamente de 0.5 a 1 cm cada una) y se suturará con prolene 4-0. Los puntos o sutura deberá ser retirada a los 7 – 10 días por lo que se le pedirá que regrese a una segunda visita en esa fecha. Su participación tendrá una duración aproximada de 7 a 10 días.

7.- ¿QUÉ ME PODRÍA PASAR POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

No hay riesgos que podría tener son dolor leve local en el sitio de la aplicación de la anestesia y toma de biopsia, moretón y aparición de algún tipo de cicatrización anormal en el sitio de toma de biopsias. En el caso de la cicatriz está será imperceptible en la mayoría de los casos ya que se logra esconder fácilmente por el cabello.

8.- ¿QUIÉN PAGARÍA LAS CUENTAS DEL HOSPITAL O DEL MÉDICO EN CASO DE QUE ME PASE ALGO?

Es poco probable que la participación en este proyecto dará como resultado un daño a los participantes. Si existe una lesión secundaria al el estudio, el sujeto deberá notificar al Investigador Principal para que reciba la atención médica necesaria en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Los gastos del estudio serán cubiertos por

parte del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario y del Centro de Investigación y Desarrollo para las Ciencias de la Salud.

9.- ¿QUÉ BENEFICIOS TENGO POR PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?

Se le consultará gratuitamente para iniciar tratamiento convencional para su problema de calvicie y de describirse o encontrarse una relación genética se valorará para ver si es candidato a otro tipo de tratamiento.

10.-¿QUÉ OTRAS OPCIONES DE TRATAMIENTO TENGO EN CASO DE NO ACEPTAR PARTICIPAR EN EL ESTUDIO?

Puede acudir a consultar con un Dermatólogo para valoración e inicio de tratamiento pero si en un futuro se logra realizar algún tratamiento más enfocado en la prevención y regulación de la herencia probablemente ya no sea candidato o pueda implicar algún costo el análisis o valoración.

11.- ¿CÓMO PROTEGERÁ MI PRIVACIDAD?

Se tomarán fotos de control de las áreas afectadas de calvicie para corroborar el patrón de afección de cada paciente las cuales se manejarán con confidencialidad y privacidad sin revelar la identidad de cada uno. Estas podrían ser utilizadas como parte del análisis, presentación y publicación de resultados del estudio.

Los datos serán almacenados y analizados en el Centro de Investigación y Desarrollo para las Ciencias de la Salud y sólo los datos serán utilizados por el investigador principal y el resto de los investigadores.

12.- ¿TENDRE QUE PAGAR ALGO DURANTE LA INVESTIGACIÓN?

No. Las tomas de muestras de piel, la valoración, la primera consulta para inicio de tratamiento convencional y la cita del retiro de puntos de sutura serán totalmente gratuitas. Este estudio no incluye el suministro o entrega de ningún medicamento como parte del mismo.

13.- ¿RECIBIRÉ ALGUN PAGO O INCENTIVO POR MI PARTICIPACIÓN?

No, en este estudio no se otorgará ningún tipo de incentivo o pago económico por su participación.

14.- ¿QUÉ VA A PASAR SI ME ARREPIENTO DE PARTICIPAR?

Su participación en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para retirarse del estudio por favor contacte a la Dra. Claudia Ancer en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario.

15.- SI TENGO PREGUNTAS, ¿AQUIEN PUEDO LLAMAR O COMUNICARME?

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor hable con la Dra. Claudia Ivette Ancer Arellano o al Dr. Osvaldo Tomás Vázquez Martínez, en el Servicio de Dermatología el Hospital Universitario, teléfono 84481465 o al correo electrónico claudiaancer@hotmail.com.

1.- Preguntas del estudio o daños llamar a: Dra. Claudia Ivette Ancer Arellano al teléfono 83481465 o 0448180118470 o al email claudiaancer@gmail.com o al Dr. Osvaldo Tomás Vázquez Martínez al 83481465.

2.-En caso de dudas de mis derechos como paciente comuníquese con:

Dr. José Gerardo Garza Leal

Presidente del Comité de Ética

Teléfono de Contacto: 8329-4050 ext 2870-74

Recuerde que este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad de Autónoma de Nuevo León.

Se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a su satisfacción. Si firma abajo indica que está de acuerdo para participar como voluntario en este estudio de investigación.

PARTE 2: FIRMAS QUE DOCUMENTAN EL ACUERDO

16.- ACUERDO

Su consentimiento para participar en la investigación será voluntario e informado. Si usted está de acuerdo en participar y si sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción, usted deberá firmar esta forma. Una vez firmada la forma, usted está de acuerdo en participar en este estudio. En caso de que usted se rehúse a participar, usted podrá retirarse sin pérdida de alguno de sus beneficios médicos.

Una vez que usted haya consentido, usted aún tendrá el derecho de retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica. Para retirarse, lo único que usted deberá hacer es informar a su médico de su decisión.

Se le ha proporcionado una copia de esta forma para quedársela y para que haga referencia a ella cuando sea necesario.

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma de la Sujeto</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma del Primer Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>

_____	_____
<i>Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio</i>	<i>Dirección</i>

_____	_____	_____
<i>Fecha</i>	<i>Firma del Segundo Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>

_____	_____
<i>Relación del Segundo Testigo con la Sujeto del Estudio</i>	<i>Dirección</i>

II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

Fecha

Firma de la Persona que Obtuvo el

Nombre en letra de molde

Consentimiento/Investigador Principal

PROTOCOLO PARA EL ANALISIS DE EXPRESIÓN GLOBAL CON MICRARREGLOS DE AFFYMETRIX. PROTOCOLO GENECHIP® 3' IVT PLUS REAGENT KIT

Día 1

Etapas 1: Preparación de los controles RNA poli-A

Antes de empezar:

- Precalentar el termociclador a 42°C
- Sacar los reactivos a descongelar, el buffer de Dil de poli-A control puede tardar de 15 a 20 minutos para descongelarse a TA.
- Evitar pipetear menos de 2 µL de volumen

Total RNA Input Amount	Serial Dilutions				Volume of 4 th Dilution to Add to Total RNA
	1 st Dilution	2 nd Dilution	3 rd Dilution	4 th Dilution	
250 ng	1:20	1:50	1:50	1:4	2 µL

Preparar las diluciones de poli-A RNA control para 250 ng de RNA total:

1. Añadir 2 µL de poli-A RNA Control Stock a 38 µL de Buffer Dil para la 1ª dilución (1:20).
2. Añadir 2 µL de la 1ª dilución a 98 µL de Buffer Dil para la 2ª dilución (1:50).
3. Añadir 2 µL de la 2ª dilución a 98 µL de Buffer Dil para la 3ª dilución (1:50).
4. Añadir 5 µL de la 3ª dilución a 15 µL de Buffer Dil para la 4ª dilución (1:4).

Etapas 2: Preparar la mezcla de RNA Total /Poly-A RNA Control

Componente	Muestra	Control 1	Muestra 2	Control 2
RNA Total (250 ng)	2.41	2.11	3	1.27
Control Poly-A (4 ^{ta} dil)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Agua	2.49	2.89	2	3.73
Volumen total	5 µL			

Etapas 3: Síntesis de la primera cadena de cDNA

1. En un cooler, preparar el Master Mix. Vórtex y spin.

Componente	1 r'xn	3 r'xns
Buffer 3' First-Strand	4 µL	13.2 µL
Enzima 3' First-Strand	1 µL	3.3 µL
Volumen Total	5 µL	16.5 µL

2. Transferir 5 µL de Master Mix a un tubo. Volumen final de reacción de 10 µL. Vórtex y spin.

3. Incubar:

Síntesis de primera cadena	T° y duración
Etapas 1	42°C 120 min
Etapas 2	4°C 2 min

4. Después de la incubación vórtex y spin.

Colocar la muestra en hielo 2 min para enfriar el plástico. No exceder de 10 min.

Etapa 4: Síntesis de la segunda cadena de cDNA

NOTA: Programar con anticipación el termociclador a 16 °C.

1. En un cooler, preparar

el Master Mix. Vórtex y spin.

Componente	1 r'xn	3 r'xns
Agua	13 µL	42.9 µL
Buffer 3'Second-Strand	5 µL	16.5 µL
Enzima 3' Second -Strand	2 µL	6.6 µL
Volumen Total	20 µL	66 µL

2. En el cooler, transferir 20 µL de Master Mix a cada muestra (10 µL). Volumen final de reacción de 30 µL. Vórtex y spin.

3. Incubar

Síntesis de segunda cadena	T° y duración
Etapa 1	16°C 60 min
Etapa 2	65°C 10 min
Etapa 3	4°C 2 min

4. Después de la incubación, dar un spin.

Etapa 5: Sintetizar cRNA marcado por Transcripción in vitro

Antes de empezar:

- Transferir las mtas. de la segunda cadena a TA ≥ 5 min mientras se prepara el Master Mix IVT.
- Dejar el buffer IVT a TA durante ≥ 10 minutos antes de preparar el Master Mix IVT.

1. Preparar IVT Mix Master a temperatura ambiente. Vórtex y spin.

Componente	1 r'xn	3r'xns
Biotina 3'IVT	4 μ L	13.2 μ L
Buffer 3'IVT	20 μ L	66 μ L
Enzima 3' IVT	6 μ L	19.8 μ L
Volumen Total	30 μ L	99 μ L

2. Transferir de 30 μ L del Master Mix IVT a cada muestra (30 μ L). Volumen final de reacción de 60 μ L. Vórtex y spin.

3. Incubar 16 horas en el termomixer.

Síntesis de segunda cadena	T° y duración
Etapa 1	40°C 16 hr
Etapa 4	4°C hold

4. Después de la incubación, dar un spin.

5. Coloque la reacción en un cooler y proceder a purificar el cRNA marcado.

Día 2. Protocolo GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit

Etapas 6: Purificar el cRNA marcado

Nota:

- Realizar a temperatura ambiente.
 - Precalentar el agua en el termociclador a 65 ° C al menos 10 min.
 - Permitir que las perlas se equilibren a temperatura ambiente
 - Preparar etanol al 80% fresco
 - Transferir la muestra de cRNA a temperatura ambiente.
1. Vortex a las perlas de purificación para resuspender las partículas magnéticas.
 2. Añadir 100 µL de las perlas a cada muestra de cRNA (60 µL) mezclar pipeteando arriba y abajo 10 veces, y transferir a un pozo de una placa de fondo en U.
 3. Incubar durante 10 min. Cubrir la placa. El cRNA se une a las perlas de purificación.
 4. Mover la placa a un soporte magnético para capturar las perlas de purificación durante ~ 5 min. La mezcla es transparente, y las perlas forman pellets contra los imanes.
 5. Aspirar con cuidado y desechar el sobrenadante sin perturbar las perlas de purificación.
 6. Lavar las perlas de purificación. En el soporte magnético, añadir 200 µL de etanol 80% a cada pozo y se incuba durante 30 seg.
 7. Poco a poco aspirar y desechar el etanol al 80% sin perturbar las perlas de purificación.

8. Realizar 3 lavados y eliminar completamente el etanol 80%.
9. Secar al aire en el soporte magnético durante 5 minutos hasta que no se vea líquido, el pellet aparece brillante.

Eluir cRNA.

1. Retire la placa del soporte magnético. Añadir a cada muestra 27 μL de agua precalentada (65 °C) e incubar durante 1 min. Se puede agregar un adicional de 10-30 μL de agua.
2. Mezclar bien pipeteando arriba y abajo 10 veces.
3. Mover la placa al soporte magnético por ~ 5 min para capturar las perlas de purificación.
4. Transferir el sobrenadante, que contiene el cRNA eluido, a un tubo libre de nucleasa.
5. Colocar las muestras purificadas cRNA en el hielo, o inmediatamente congelar las muestras a -20 ° C para su almacenamiento.

Etapas 7: Evaluar rendimiento de cRNA

1. Medir absorbancia a 260 nm en NanoDrop.
2. Utilizar agua libre de nucleasa como blanco.
3. Utilizar 1,5 μL de la muestra de cRNA directamente.
4. Las muestras con concentraciones de cRNA superior a 3,000 ng / μL se deben diluir.

Cantidad de cRNA marcado requerido para fragmentación para un formato 49 de microarreglos 15 µg (en 1 a 32 µL)

Etapa 8: Fragmentar el cRNA marcado

1. En un cooler preparar la cantidad requerida de cRNA marcado (15 µg).
2. En un cooler preparar la reacción de fragmentación. Vortex y spin.

Componente	Formato 49
cRNA marcado	15 µg (en 1 a 32 µL)
Buffer de fragmentación	8 µL
Volumen Total	40 µL

3. Incubar

Reacción de fragmentación	T° y duración
Tapa	94°C
Etapa 1	94°C 35 min
Etapa 2	4°C hold (2 min)

4. Inmediatamente después de la incubación, dar un spin.

5. Colocar la muestra sobre hielo

Etapa 9: HIBRIDACIÓN

1. Encender el horno de hibridación, ajustar la temperatura a 45°C y las RPM a 60. Dejar que el horno se precaliente.

2. Equilibrar los microarreglos a temperatura ambiente antes de su uso. Etiquetar el microarreglo con el nombre de la muestra.
3. Calentar el buffer de pre-hibridación a temperatura ambiente.
4. A temperatura ambiente, descongelar los componentes para el Master Mix de hibridación.
5. Calentar los controles de hibridación 20X a 65 ° C por 5 min en el termomixer.
6. A temperatura ambiente, preparar el Master Mix de hibridación. Vórtex y spin.

Formato 49		
Componente	1 r'xn	3r'xns
Control Oligo B2 (3 nM)	3.7 µL	12.21 µL
Controles de hibridación 20X (bioB, bioC, bioD, cre)	11 µL	36.3 µL
Mix de Hibridación 2X	110 µL	363 µL
DMSO	22 µL	72.6 µL
Agua	43.9 µL	144.87 µL
Volumen Total	190.6 µL	628.98 µL

Pre-hibridación del microarreglo.

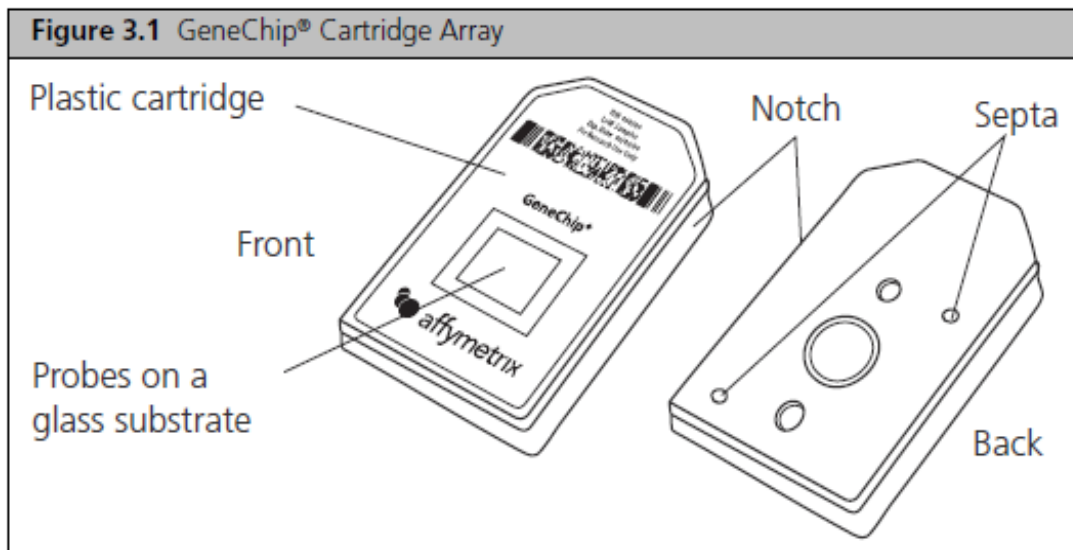
1. Inserte una punta de pipeta en el tabique superior derecho para permitir la ventilación.
2. Humedecer el microarreglo con un volumen apropiado de Mix de Pre-hibridación llenándolo a través del septo inferior izquierdo. Llenarlo verticalmente.

Volumen de Mix de Pre-hibridación para cargar en un microarreglo de formato 49: 200 µL.

3. Retirar la punta de pipeta del tabique superior derecho del microarreglo.

NOTA: Revisar que el septo de llenado no tenga líquido. Secar con kim wipes.

4. Incubar el microarreglo con el Mix de Pre-hibridación a 45 °C con 60 rpm por 10 a 30 min.



Preparar el Cóctel de hibridación.

1. A temperatura ambiente, añadir el Master Mix de hibridación a cada muestra de cRNA

fragmentado y marcado con biotina para preparar el Cóctel de hibridación. Vórtex y spin.

Formato 49		
Componente	1 r'xn	3 r'xn
Master Mix de hibridación	190.6 µL	628.98
cRNA marcado y fragmentado	29.4 µL (11 µg)	97.02
Volumen Total	220 µL	726

2. Incubar .

Reacción de fragmentación	T° y duración
Tapa	99°C
Etapa 1	99°C 5 min (termomixer)
Etapa 2	45°C 5 min (Horno)

1. Después de la incubación, dar un spin.

Hibridar el microarreglo.

1. Retirar el microarreglo del horno de hibridación. Extraer el mix de pre-hibridación del microarreglo con una micropipeta.

2. Rellenar el microarreglo con el volumen apropiado del cóctel de hibridación.

Volumen de coctel de hibridación para cargar en un microarreglo de formato 49
200 µL

3. Cubrir ambos septos con doble Tough-Spots 1/2" para minimizar la evaporación y/o prevenir fugas.

4. Colocar los microarreglos en las bandejas del horno de hibridación.

NOTA: Asegurarse de que la burbuja dentro de la cámara de hibridación flota libremente al girar para permitir que el cóctel de hibridación haga contacto con todas las partes del microarreglo.

2. Incubar a 45 ° C con rotación a 60 rpm durante 16 horas.

Día 3. Protocolo GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit

Etapas 10: Lavado y tinción

1. Retirar los microarreglos del horno. Retirar los Tough-Spots.
2. Permitir que los microarreglos se equilibren a temperatura ambiente antes del lavado y la tinción.
3. Extraer el cóctel de hibridación de cada microarreglo.
4. Llenar cada microarreglo completamente con buffer de lavado A.

NOTA: los microarreglos pueden ser almacenados en el buffer de lavado A a 4°C durante un máximo de 3 horas antes de continuar con el lavado y la tinción

5. Colocar los viales en soportes de muestra en la estación de fluidos:
 - A. Coloque un vial (ámbar) conteniendo 600 µL de cóctel de tinción 1 en el soporte 1.
 - B. Coloque un vial (claro) conteniendo 600 µL de cóctel de tinción 2 en el soporte 2.
 - C. Coloque un vial (claro) conteniendo 800 µL de Holding Buffer en el soporte 3.
6. Lavar y teñir los microarreglos según el tipo de microarreglo.

Protocolo de fluidos para un microarreglo de formato 49
--

FS450_0001

7. Comprobar si hay burbujas de aire. Si hay burbujas de aire, llenar manualmente el microarreglo con Holding Buffer. Si no hay burbujas de aire, cubrir tanto los septos con 3/8" Tough-Spots.

Inspeccionar la superficie de vidrio del microarreglo y limpiar el polvo y / u otras partículas con un kim wipe antes de escanear.

Etapas 11: Escanear

Registrar la muestra y la información del microarreglo en el programa AGCC.

PLATAFORMA DE MICROARREGLOS-ESTACIÓN DE FLUIDOS CUIDADO Y MANTENIMIENTO

CUIDADO DE LOS INSTRUMENTOS

- Utilice un protector en la línea de alimentación a la estación de fluidos.
- Deje correr un protocolo de Shutdown cuando el instrumento se vaya a apagar o no vaya a ser utilizado toda la noche o más tiempo. Esto evitará la formación de cristales de sal dentro del sistema de fluidos.
- Cuando no utilice el aparato, deje que las agujas de muestra en posición hacia abajo. Cada aguja debe extenderse en un vial vacío. Esto las protegerá de daños accidentales.
- Utilice siempre agua desionizada para evitar la contaminación de las líneas. Cambiar los buffers con buffer recién preparado en cada inicio del sistema.
- La estación de fluidos se debe colocar sobre una mesa nivelada y firme lejos de temperaturas extremas y de movimiento de aire.

Importante: Antes de realizar el mantenimiento, desconecte la alimentación de la estación para evitar daños en caso de una bomba o un mal funcionamiento eléctrico.

MANTENIMIENTO DE INSTRUMENTOS

PROTOCOLO BLEACH (BLANQUEO)

- ☐ Affymetrix recomienda un protocolo de limpieza semanal de la estación de fluidos. Este protocolo utiliza comúnmente hipoclorito de sodio comercial (CLOROX).
- ☐ Este protocolo está diseñado para eliminar cualquier complejo SAPE-anticuerpo residual que puede estar presente en los tubos y agujas de la estación de fluidos. Este

protocolo se lleva a cabo utilizando una solución blanqueadora (solución de hipoclorito de sodio) a través del sistema, seguido por un ciclo de enjuague con agua desionizada (DI).

- ☐ Este protocolo tarda aproximadamente una hora y cuarenta minutos en completarse.
- ☐ Affymetrix recomienda ejecutar este protocolo semanalmente o cuando se cambie de protocolo como por ejemplo del protocolo de expresión a genotipificación.

CICLO DE BLANQUEO

Para evitar el arrastre o la contaminación cruzada, el protocolo de blanqueo Affymetrix recomienda el uso de botellas exclusivas para blanqueador y agua DI.

1. Preparar 500 mL de solución de hipoclorito de sodio 0,525% utilizando agua desionizada. Por ejemplo, siga estas instrucciones para hacer 500 mL de solución de blanqueo.
2. En un recipiente de plástico de 1 litro combinar 43,75 mL de blanqueador comercial (tal como blanqueador Clorox ®, que es hipoclorito de sodio 6%) con 456,25 mL de DI H₂O, mezclar bien. Vierta la solución en una botella de plástico de 500 mL, y coloque la botella de plástico en la estación de fluidos.

Importante: La vida útil de esta solución es de 24 horas. Después de este período, debe preparar una solución fresca.

Nota: Cada estación de fluidos con cuatro módulos requiere 500 mL de solución de hipoclorito de sodio 0,525%.

3. Coloque en la estación de fluidos una botella de residuos de 1L vacía, una botella de 500 mL con la solución blanqueadora y una botella de 1L de agua DI como se muestra en la Figura 3.2. Inserte el tubo de residuos en la botella de residuos (Figura 1).
4. Sumerja las tres líneas de lavado (líneas de lavado A-B y la línea de agua) de la estación de fluidos en la botella con 500 mL de solución de cloro (Figura1). **NO SUMERJA LA LÍNEA DE RESIDUOS EN LA SOLUCIÓN DE BLANQUEO.**

Nota: El protocolo BLEACH requiere aproximadamente un litro de agua DI.



Figura 1. Ciclo de blanqueo. Sumergir las 3 líneas de lavado en la solución con hipoclorito de sodio 0.525%. La línea de residuos permanece en la botella de residuos.

5. En AGCC Launcher, click en el icono AGCC Fluidics Control; o Click en Programs Affymetrix → Command Console → AGCC Fluidics Control.
6. En la lista desplegable Protocolo, seleccione el protocolo de BLEACH actual (ejemplo BLEACHv2_450) para cada uno de los respectivos módulos.
7. En la sección Station ID, seleccione los cuatro módulos, de 1 a 4, y haga clic en Copy to select modules y después en Run all (Ejecutar).
8. Siga las instrucciones en cada una de las pantallas. Cargar los módulos vacíos con tubos de 1,5 mL, si aún no lo ha hecho. Presione hacia abajo cada una de las palancas de las agujas para iniciar el protocolo de blanqueo.

La estación de fluidos comenzará el protocolo y comenzará a vaciar las líneas y llevará a cabo los ciclos de limpieza con la solución de blanqueo (solución de cloro).

9. Después de aproximadamente 30 minutos, la pantalla LCD le indicará cuando el ciclo de blanqueo está terminado y el ciclo de enjuague debe comenzar.

CICLO DE ENJUAGUE

Una vez que el ciclo de bleach ha terminado, la segunda parte del protocolo es una etapa de enjuague. Este paso es esencial para eliminar los restos de cloro del sistema. Si no se completa este paso puede resultar en chips dañados.

1. Siga las instrucciones en la pantalla para cada módulo. Levante la palanca de agujas y saque los viales de blanqueo. Cargar los viales limpios y vacíos en cada módulo.
2. Retire las tres líneas de lavado de la botella de bleach y transfíralas a la botella de agua DI (Figura 2). En este paso, usted no necesita enjuagar el cloro que queda en las líneas.



Figura 2. Ciclo de enjuague.

3. Presione hacia abajo las palancas de las agujas para comenzar el ciclo de enjuague. La estación de fluidos vaciará las líneas y enjuagará las agujas.

4. Cuando el ciclo de enjuague se completa después de aproximadamente una hora, la estación de fluidos regresará a la temperatura de 25 ° C y vaciará las líneas de aire.
5. En la pantalla LCD se leerá limpieza hecha (CLEANING DONE).
6. Descartar los viales utilizados para el protocolo de blanqueo (BLEACH).
7. Si planea utilizar el sistema inmediatamente una vez que se haya completado el protocolo de BLEACH, siga con el protocolo PRIME450.

EXTRACCIÓN DE ADN CON EL KITISOLATE II GENOMIC DNA - BIOLINE

Purificación de ADN de tejido humano

Antes de empezar:

- Asegurarse que el buffer GW2 y la proteínasa K estén preparados.
- Programar incubadora o baño de agua a 56°C.
- Precalentar el buffer de elución G a 70°C.

Preparación de la muestra:

1. Cortar 25 mg del tejido de interés. Colocar la muestra en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
2. Pre-lisis: agregar 180 µL de buffer de lisis GL y 25 µL de solución de proteinasa K, cubrir completamente la muestra con la solución y dar vórtex.
3. Incubar de 1 a 3 horas a 56 °C hasta obtener lisis completa del tejido. La muestra puede ser incubada toda la noche en caso necesario.

4. Lisis: dar vortex a la muestra y agregar 200 μ L de buffer de lisis G3. Vortex vigorosamente e incubar a 70 C por 10 minutos. Si continúan observándose partículas se centrifuga por 5 minutos a velocidad alta y se decanta el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga.
5. Ajustar condiciones para la unión del ADN: vortex breve y agregar 210 μ L de etanol 100% a la muestra. Dar Vórtex vigorosamente.
6. Unión del ADN: para cada muestra colocar una Spin Column en un tubo colector. Agregar toda la muestra a la columna y centrifugar por 1 minuto a 11 000 xg. Descartar el flujo y reusar el tubo colector. Repetir la centrifugación con las mismas condiciones.
7. Lavado de membrana de silica: agregar 500 μ L de Wash Buffer GW1. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 xg. Descartar el sobrenadante y reusar el tubo colector. Agregar 600 μ L de Wash Buffer GW2 a la columna. Centrifugar por 1 minuto a 11 000 xg. Descartar el sobrenadante y reusar el tubo colector.
8. Secar la membrana de silica: Centrifugar por 1 minuto a 11 000 xg para remover el etanol. Colocar la columna en un nuevo tubo de microcentrifuga.
9. Elución del ADN: Agregar 100 μ L de Buffer de elución o agua grado biología molecular a 70°C directamente a la membrana de la columna e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar por 1 minuto a 11000 xg.
10. Retirar la columna, cerrar el tubo y almacenar a -20°C.

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO CON KIT GENTRA® PUREGENE

QIAGEN

1. Colocar 900 μ L de solución de lisis RBC en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Agregar 1 mm de biopsia fresca y mezclar por inversión 10 veces.
3. Incubar 1 min a temperatura ambiente (15–25°C). Invertir al menos una vez durante la incubación.
4. Centrifugar 20 s a 13,000–16,000 x g para sedimentar las células blancas de la sangre.
5. Cuidadosamente descartar el sobrenadante con pipeta o decantando, dejando aproximadamente 10 μ L de líquido residual y las células blancas sanguíneas sedimentadas.
6. Vórtex al tubo vigorosamente para resuspender el sedimento en el líquido residual.
*El vórtex facilita la lisis celular en la siguiente etapa. El sedimento debe estar completamente disperso después del vórtex.
7. Agregar 300 μ L de la solución de lisis celular, y agitar con pipeta hacia arriba y hacia abajo para lisar las células o agitar vigorosamente durante 10 s. *Usualmente la incubación no es requerida; sin embargo si las células son visibles, incubar a 37 °C hasta que la solución sea homogénea.*Las muestras son estables en solución de lisis celular por al menos dos años a temperatura ambiente.
8. Opcional: si es requerido DNA libre de RNA, agregar 1.5 μ L de solución de RNasa y mezclar por inversión 25 veces. Incubar 15 min a 37°C. Después incubar 1 min en hielo rápidamente para enfriar la muestra.

9. Agregar 100 μ L de solución de precipitación de proteínas, y llevar a vórtex vigorosamente por 20 s a alta velocidad.
10. Centrifugar 1 min a 13,000–16,000 x g. *Las proteínas precipitadas deben formar un compacto y oscuro sedimento marrón. Si el pellet de proteína no está compacto, incubar en hielo durante 5 minutos y repetir la centrifugación.
11. Colocar 300 μ L de isopropanol en un tubo de 1.5 mL limpio y añadir el sobrenadante del paso anterior cuidadosamente. Asegúrese de que el pellet de proteína no se desplace durante el vertido.
12. Mezclar suavemente por inversión 50 veces hasta que el ADN pueda ser visualizado como hilos o precipitado ligero.
13. Centrifugar durante 1 min a 13.000 -16.000 xg. *El ADN puede ser visible como un pequeño precipitado blanco.
14. Con cuidado, descartar el sobrenadante, y drenar el tubo por inversión en una hoja limpia de papel absorbente, teniendo cuidado de que el pellet se mantenga en el tubo.
15. Añadir 300 μ L de etanol al 70% e invertir varias veces para lavar el sedimento de ADN.
16. Centrifugar durante 1 min a 13.000-16.000 xg. Cuidadosamente, descartar el sobrenadante. Vacíe el tubo en un pedazo limpio de papel absorbente, teniendo cuidado de que el pellet se mantenga en el tubo. Deje secar al aire el precipitado durante 5 minutos. La pastilla podría estar suelta y ser desplazada con facilidad.*Evitar el exceso de secado del precipitado de ADN, ya que será difícil de disolver.

17. Añadir 100 μ L de solución de hidratación del ADN y vórtex durante 5 s a velocidad media para mezclar.
18. Incubar a 65 ° C durante 5 min para disolver el ADN. Incubar a temperatura ambiente durante la noche con agitación suave. Asegúrese de que la tapa del tubo este herméticamente cerrada para evitar fugas. Las muestras se pueden centrifugar brevemente y transferir a un tubo de almacenamiento

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA- VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN.

1. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA AL 1%.

- 1.1 Pesar .35 g de agarosa y agregar 35 ml de TBE 1X, calentar a ebullición en una placa de calentamiento hasta disolver la agarosa.
- 1.2 Verter la agarosa en el molde, asegurando que no queden burbujas y colocar el peine en las ranuras correspondientes del molde. Dejar solidificar.
- 1.3 Desmontar el molde y colocarlo en la cámara de electroforesis.
- 1.4 Agregar TBE1X a la cámara de electroforesis hasta que cubra completamente el gel.

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- 2.1 Colocar 1µL de buffer de carga GelRed en un molde para carga limpio y seco.
- 2.2 Agregar 5 µL de muestra (DNA) y mezclar bien.
- 2.3 Depositar en los pocillos del gel las muestras bien mezcladas siguiendo un orden previamente establecido.

3. ELECTROFORESIS

- 3.1 Conectar correctamente los cables de la cámara en la fuente de poder. El cable que se encuentra hacia el lado donde se aplicaron las muestras conectarlo al polo negativo (cátodo/color negro) y el cable del otro extremo, hacia donde migraran las muestras conectarlo al polo positivo (ánodo/color rojo).
- 3.2 Ajustar el voltaje a 100 volts por 45 minutos.

4. FOTODOCUMENTACIÓN

- 4.1 Encender la PC y el equipo, Abrir el programa Quantity one, dar click en Select scanner, después seleccionar GEL DOC XR, abrir la puerta del equipo y encender la luz blanca. Acomode el gel en el centro lo cual puede observar en la ventana del programa. Cerrar la puerta del equipo y encender la lámpara UV. Obtener y guardar las imágenes.